

**Untersuchungen zur
posttranslationalen präS-Translokation
des großen Hüllproteins
des Hepatitis-B-Virus**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Carsten Lambert

geboren in Oberwesel
Mainz, 2001

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2001

Für Luise und Anna

Teile dieser Arbeit wurden bisher wie folgt publiziert:**Lambert, C., and Prange, R. (2001).**

Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation.

J Biol Chem **276**(25), 22265-72.

Selected to appear in Current Awareness in Biomedicine: Proteins: Post Translational Processing.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden von mir auf folgenden Kongressen vorgestellt:national:

- **Jahrestagung 2000 der Gesellschaft für Virologie.** 26.04.-29.04.2000 in Wien.
Carsten Lambert and Reinhild Prange.
Poster: Posttranslational preS translocation of the hepatitis B virus large envelope protein occurs within the ER.
- **Jahrestagung 2001 der Gesellschaft für Virologie.** 14.03.-17.03.2001 in Dresden.
Lambert C., Prange R.
Vortrag: Topological heterogeneity of the hepatitis B virus large envelope protein: parameters affecting posttranslational preS translocation.

international:

- **Molecular biology of hepatitis B viruses.** 18.09.-21.09.2000 in Paris.
Carsten Lambert and Reinhild Prange.
Vortrag: Mixed topology of the large envelope protein of hepatitis B virus: structural and compartmental requirements for posttranslational preS translocation.

- **Molecular biology of hepatitis B viruses.** 29.07.-02.08.2001, University of Massachusetts.
Carsten Lambert and Reinhild Prange.
Vortrag: Topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: analysis of host-cell protein assistance.
- **Cell Biology of Virus Infection EMBO Workshop.** 22.09.-26.09.2001 in Heidelberg.
Carsten Lambert and Reinhild Prange.
Poster: Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation.

Weitere Veröffentlichung:

C. Hartmann-Stühler, C. Lambert, A. Peichel, H. Löffler-Mary, J. Dumortier, M. Werr and R. Prange (1999).

Hepatitis B virus morphogenesis: Structure requirements of the envelope proteins.

Recent Research Developments in Virology **1**:251-68

Inhaltsverzeichnis:

I.	EINLEITUNG	1
1.	Das Hepatitis-B-Virus	1
1.1	Struktur und Genomorganisation.....	3
1.2	Replikation und Infektionszyklus.....	5
2.	Die HBV-Hüllproteine und ihre Rolle bei der Virusmorphogenese	11
3.	Die Biogenese von Membranproteinen	15
3.1	Die Struktur des Translokons und seiner Komponenten.....	15
3.2	Translokation und Integration an der Membran des Endoplasmatischen Reticulums.....	17
4.	Zielsetzung	19
II.	MATERIAL UND METHODEN	20
1.	Material	20
1.1	Zelllinien.....	20
1.2	Plasmide.....	20
1.3	Antikörper.....	23
1.4	Lösungen.....	24
2.	Methoden	24
2.1	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2	Zellbiologische Methoden.....	25
2.2.1	Kultivierung von COS7-Zellen.....	25
2.2.2	Transiente Expression in COS7-Zellen.....	25
2.2.3	Brefeldin A-Behandlung von COS7-Zellen.....	25
2.2.4	Metabolische radioaktive Proteinmarkierung.....	26
2.2.5	Proteinexpression unter reduzierenden Bedingungen.....	26
2.3	Nachweis und Charakterisierung von Proteinen.....	27
2.3.1	Proteaseschutzversuche.....	27
2.3.2	Enzymatische Deglykosylierung durch Peptid:N-Glykosidase F.....	28
2.3.3	Natriumcarbonat-Extraktion.....	28
2.3.4	Immunpräzipitation.....	29

2.3.5	Zellyse unter nichtdenaturierenden Bedingungen.....	29
2.3.6	Koimmunpräzipitation.....	29
2.3.7	Herstellung eines Nycodenz-Gradienten zur subzellulären Fraktionierung.....	30
2.3.8	Subzelluläre Fraktionierung.....	30
2.3.9	Semi-Permeabilisierung von COS7-Zellen durch Digitonin.....	31
2.3.10	Expression von Proteinen <i>in vitro</i>	31
2.4	Immunologische Methoden.....	33
2.4.1	HBsAg-ELISA.....	33
2.4.2	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	33
III.	ERGEBNISSE	35
1.	Untersuchungen zum Mechanismus der posttranslationalen präS- Translokation des HBV L-Hüllproteins	35
1.1	Die Bedeutung struktureller Determinanten des L-Moleküls für die posttranslationale präS-Translokation.....	35
1.1.1	Einführung in das experimentelle System anhand des L-Wildtyp- Proteins.....	35
1.1.2	Die HBV S- und M-Hüllproteine sind für die präS-Translokation des L-Proteins entbehrlich.....	40
1.1.3	Disulfidbrücken-vermittelte Di- und Oligomerisierungen von L- Molekülen sind für die präS-Translokation entbehrlich.....	41
1.1.4	Die amphipathischen Transmembrandomänen TM1, TM3 und TM4 des L-Proteins werden für die präS-Translokation nicht benötigt.....	43
1.1.5	Die hydrophobe Transmembrandomäne TM2 des L-Proteins ist für die präS-Translokation notwendig.....	46
1.1.6	Die hydrophobe Transmembrandomäne TM2 des L-Proteins ist für die präS-Translokation ausreichend.....	48
1.1.7	Die hydrophobe Transmembrandomäne TM2 des L-Proteins kann durch eine fremde Transmembrandomäne nicht ersetzt werden.....	50
1.1.8	Das postulierte präS2-spezifische Translokationsmotiv beeinflusst die präS-Translokation nicht.....	52
1.2	Das Translokationsverhalten von HBV-DHBV-Chimären.....	53

1.2.1	Der Einfluß der DHBV S-Region.....	54
1.2.2	Der Einfluß der DHBV präS-Region.....	55
2.	Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation der posttranslationalen präS-Translokation von L.....	58
2.1	Intrazelluläre Lokalisation von L nach transienter Expression.....	58
2.2	Die posttranslationale präS-Translokation von L findet nicht im Golgi-Komplex statt.....	60
2.3	Die posttranslationale präS-Translokation von L findet im ER statt.....	62
3.	Die Bedeutung wirtseigener Komponenten für die posttranslationale präS-Translokation von L.....	64
3.1	Untersuchungen zur Kinetik der Membranverankerung von L.....	64
3.2	Das L-Protein interagiert <i>in vivo</i> mit den zellulären Chaperonen BiP, Hsc70 und Hsp40.....	66
4.	Untersuchungen zur Rekonstitution der posttranslationalen präS-Translokation <i>in vitro</i>.....	69
IV.	DISKUSSION.....	73
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	88
VI.	LITERATURVERZEICHNIS.....	91
VII.	ANHANG.....	104
1.	Abkürzungsverzeichnis.....	104
2.	Abbildungsverzeichnis.....	106

I. Einleitung

1. Das Hepatitis-B-Virus

Das humane Hepatitis-B-Virus (HBV) ist der Prototyp einer Familie von Viren, die als *Hepadnaviridae* bezeichnet wird. Eng verwandte Viren von HBV wurden im Waldmurmeltier (WHV = woodchuck hepatitis virus) (Summers *et al.*, 1978) und im Erdhörnchen (GSHV = ground squirrel hepatitis virus) (Marion *et al.*, 1980) identifiziert. Diese Viren besitzen etwa eine 70%ige Sequenzhomologie zu HBV, sind jedoch nicht in der Lage, Menschen oder andere Primaten zu infizieren. Etwas weiter entfernt verwandte Hepadnaviren mit einer vergleichbaren Genomorganisation, jedoch nur geringer Sequenzhomologie wurden in der Ente (DHBV = duck hepatitis B virus) (Mason *et al.*, 1980), dem Reiher (HHBV = heron hepatitis B virus) (Sprengel *et al.*, 1988) und anderen Vogelarten identifiziert. *In vivo*-Studien, vor allem der DHBV- und WHV-Infektionen, haben entscheidend zu einem besseren Verständnis der Interaktionen zwischen den Hepadnaviren und ihrem Wirt beigetragen. Im folgenden konzentrieren sich die Beschreibungen jedoch auf das humane Hepatitis-B-Virus und seine Interaktionen mit der Wirtszelle.

Eine Infektion mit HBV führt zu transienten und chronischen Entzündungen der Leber. Der Verlauf der Infektion ist sehr variabel und wird überwiegend von der Immunantwort des menschlichen Organismus bestimmt. Während 90-95% der Patienten nach einer akuten Infektion das Virus völlig eliminieren können, entwickelt sich in 5-10% der Fälle eine chronische Verlaufsform, die zumeist asymptomatisch bleibt, jedoch auch zur Ausbildung einer Leberzirrhose und letztlich zum hepatozellulären Karzinoms (HCC) führen kann.

Nach einer Inkubationsphase von 45-120 Tagen ist die akute Phase der viralen Hepatitis vor allem durch die Ausbildung einer Gelbsucht (Ikterus) gekennzeichnet. Die Anhäufung von Bilirubin im Blut und der Haut ist die Folge einer inflammatorischen Leberschädigung. Ein direkter zytopathischer Effekt von HBV konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Vielmehr ist die zellvermittelte und humorale Immunantwort, die gegen das Virus aufgebaut wird, wesentlich für das Krankheitsbild verantwortlich. Da das Virus primär Leberzellen infiziert und innerhalb der Leber repliziert, ist die Immunantwort hauptsächlich gegen infizierte Hepatozyten gerichtet. Die Entfernung des Virus scheint vorwiegend durch humanes Leukozyten-Antigen- (HLA-) Klasse-I restringierte, zytotoxische T-Zellen vermittelt zu werden. Diese erkennen Peptide der Virusproteine, die auf der Zelloberfläche der Hepatozyten präsentiert werden und können somit eine regulierte Eliminierung der infizierten

Zelle herbeiführen (Mondelli *et al.*, 1982; Bertoletti *et al.*, 1991; Chisari und Ferrari, 1995). Gleichzeitig spielt jedoch auch die Produktion von Zytokinen (vor allem Interferone) eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle und Entfernung von HBV (Guidotti und Chisari, 2001). Etwa ein Prozent der Fälle einer akuten Hepatitis B nehmen aufgrund einer Überreaktion des Immunsystems einen fulminanten, meist tödlichen Verlauf.

Gegen eine HBV-Infektion kann seit 1984 mit einem rekombinanten Impfstoff vorgebeugt werden (McAller *et al.*, 1984). Die Impfung ist in 95% der Fälle wirksam. Für die weltweit etwa 350 Millionen chronischen Virusträger gibt es jedoch bislang keine befriedigende Therapie. Die Entwicklung einer chronischen Hepatitis B ist hauptsächlich von wirtsspezifischen Faktoren abhängig (Barnaba und Balsano, 1992). Bei etwa 5-10% der akut infizierten Erwachsenen, 30-50% der infizierten Kleinkinder und etwa 90% perinatal infizierter Säuglinge kommt es zu einer chronischen Verlaufsform. Dabei findet häufig eine Integration der HBV-DNA ins Wirtsgenom statt, wobei weder im Virus- noch im Wirtsgenom einheitliche Integrationsstellen existieren (Koshy *et al.*, 1983). Bei einer chronisch-aktiven Hepatitis, in deren Verlauf weiterhin HBV-Replikation nachgewiesen werden kann, kommt es in 10-30% der Fälle zur Leberzirrhose und bei etwa 10% zum HCC. Eine wesentliche Ursache der HCC-Entstehung ist offensichtlich die DNA-Integration ins Wirtsgenom. Sie wird bei mehr als 85% der HCC-Patienten beobachtet (Brechot *et al.*, 1980). HBV ist folglich zu den krebserregenden DNA-Viren zu zählen.

Eine Besonderheit der Hepatitis-B-Virus-Infektion besteht darin, daß infizierte Zellen neben den vollständigen Viren auch nichtinfektiöse sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 20 nm sezernieren, die nur aus der äußeren HBV-Hüllmembran bestehen. Diese werden in 10000- bis 1 Million-fachem Überschuß gegenüber den Viren in die Blutbahn abgegeben. In geringem Umfang kommen neben den spärlichen, auch filamentöse Partikel mit einem Durchmesser von 20 nm und variabler Länge vor. Alle Formen besitzen auf ihrer Oberfläche ein gemeinsames Antigen, das als Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) bezeichnet wird.

1.1 Struktur und Genomorganisation

Das humane Hepatitis-B-Virus wurde 1970 von Dane et al. entdeckt (Dane *et al.*, 1970). Es ist ein kugelförmiges, umhülltes DNA-Virus (Tiollais *et al.*, 1985) mit einem Durchmesser von 42 nm (Abb. 1).

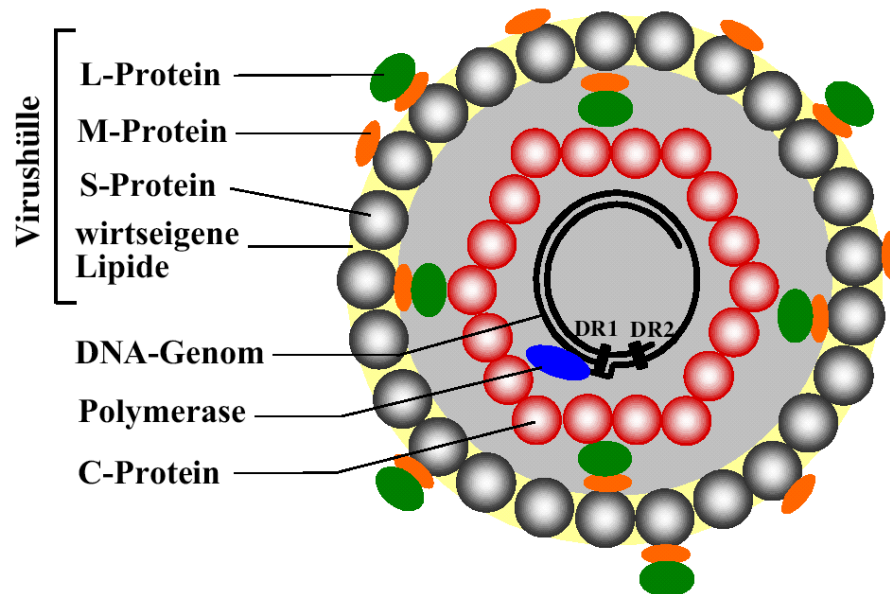


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Hepatitis-B-Virus.

Die Virushülle beinhaltet die viralen Hüllproteine L, M und S. Die Polypeptidsequenz des S-Proteins (grau) findet sich im M- und L-Protein wieder. Das M-Protein besitzt eine zusätzliche präS2-Domäne (orange) und das L-Protein besitzt neben der präS2- eine zusätzliche präS1-Domäne (grün). Zusammen werden präS1 und präS2 als präS-Region bezeichnet. Die präS-Region des L-Proteins ist sowohl im Inneren des Virus als auch auf der Außenseite lokalisiert. Das virale Kapsid wird durch das C-Protein (rot) aufgebaut. Das virale Genom im Inneren des Kapsids besteht aus einer partiell-doppelsträngigen, zirkulären DNA. Das 5'-Ende des vollständigen Minusstrangs ist kovalent mit der viralen Polymerase (blau) verbunden. DR1 und DR2 sind Sequenzwiederholungen, die bei der Replikation des Genoms eine Rolle spielen. Abbildung modifiziert nach Nassal (1999).

Das Virion besteht aus einer äußeren Lipoproteinmembran, die drei virale Glykoproteine enthält. Die Hüllproteine werden als kleines (small) S-, mittleres (middle) M- und großes (large) L-Protein bezeichnet. Die Hüllmembran umschließt ein ikosaedrisches Nukleokapsid. *In vitro* wurden zwei unterschiedliche Kapsidformen entschlüsselt (Crowther *et al.*, 1994; Bottcher *et al.*, 1997; Wynne *et al.*, 1999), von denen die eine Form aus 240 Kapsomeren (C-Protein, p21) besteht und einen Durchmesser von 34 nm aufweist, und die andere Form nur aus 180 C-Proteinen aufgebaut ist und einen Durchmesser von 30 nm besitzt. Im Inneren des Kapsids befindet sich die virale DNA. Mit etwa 3,2 kb ist das HBV-Genom eines der kleinsten viralen Genome, die zur Zeit bekannt sind (Galibert *et al.*, 1979). Es weist mit vier überlappenden offenen Leserahmen (ORF) eine sehr kompakte Organisation auf. Kovalent an

das Genom gebunden ist die virale Polymerase (P-Protein, p95) (Gerlich und Robinson, 1980), ein Proteinkomplex, der aus mehreren funktionellen Domänen besteht (Toh *et al.*, 1983; Bartenschlager und Schaller, 1988; Radziwill *et al.*, 1990). Das P-Protein besitzt eine Region, die als N-terminales Protein (TP) bezeichnet wird, eine „Spacer“-Region (SP), eine reverse Transkriptase (RT) und eine C-terminale Ribonuklease H (RNaseH). Weiterhin enthält das Nukleokapsid wenigstens zwei wirtseigene Proteine, wie das zelluläre Chaperon Hsp90, das mit der viralen Polymerase interagiert (Hu und Seeger, 1996; Hu *et al.*, 1997) und eine Protein-Kinase C (PKC) (Albin und Robinson, 1980; Kau und Ting, 1998), welche die Fähigkeit besitzt, das C-Protein zu phosphorylieren (Yeh *et al.*, 1990; Machida *et al.*, 1991).

Das Genom des Hepatitis-B-Virus (Abb. 2) besteht aus einem partiell-doppelsträngigen, offen-ringförmigen DNA-Molekül (rcDNA) (Robinson, 1977). Die Lücke des vollständigen Minusstrangs wird vom 5'-Bereich des unvollständigen Plusstrangs überlappt und zusammengehalten. Das P-Protein ist kovalent mit dem 5'-Ende des Minusstrangs verknüpft. Der Plusstrang besitzt kein definiertes 3'-Ende, sondern weist eine variable Länge von etwa 50-75% der Länge des Minusstrangs auf. Die 5'-Enden beider DNA-Ketten weisen je eine kurze Sequenzwiederholung (DR = direct repeat) von 11 Nukleotiden auf. Diese Bereiche sind entscheidend an der DNA-Replikation beteiligt (Will *et al.*, 1987). Die vier offenen Leserahmen des Genoms kodieren die HBV-Proteine. Der X-ORF kodiert einen pleiotropisch wirkenden Transkriptionsaktivator (X). Das genaue Funktionsspektrum von X ist strittig. Das Protein scheint jedoch für die Etablierung einer Infektion essentiell zu sein (Zoulim *et al.*, 1994). Der präC/C-ORF kodiert einerseits ein prä-Kapsidprotein (präC), das eine N-terminale ER-Signalsequenz besitzt und folglich in den Sekretionsweg der Zelle geleitet wird, und andererseits das Kapsidprotein (C). präC wird während der Sekretion an beiden Enden prozessiert und gelangt schließlich als HBe-Antigen (HBeAg, p17) in das Serum (Ou *et al.*, 1986; Garcia *et al.*, 1988). Die Funktion des HBe-Antigens ist nicht bekannt. Der P-ORF umfaßt etwa 80% des gesamten Genoms und kodiert das virale P-Protein, während der env-ORF die drei Hüllproteine kodiert. Die transkriptionelle Aktivität der HBV-Gene wird durch regulierende Elemente gesteuert. So besitzt jedes Gen wenigstens einen Promotor, der durch virale Enhancer-Elemente reguliert wird (Abb. 2) (Shaul *et al.*, 1985; Yee, 1989; Yuh und Ting, 1990). Promotor- und Enhancer-Elemente wiederum werden vor allem durch leberspezifische Transkriptionsfaktoren beeinflusst (z.B. HNF-1 und -4 = hepatocyte nuclear factor) (Courtois *et al.*, 1988; Lopez-Cabrera *et al.*, 1990; Schaller und Fischer, 1991). Ein weiteres regulierendes Element ist das „glucocorticoid-responsive element“ (GRE), welches eine Enhancer-I-vermittelte Steigerung der Promotor-Aktivität durch Glukokortikoide

ermöglicht (Tur-Kaspa *et al.*, 1986). Und letztlich ist auch dem Enhancer-II ein Regulator vorgeschaltet, das „negativ-regulierende Element (NRE) (Lo und Ting, 1994). Wie sich das Zusammenspiel all dieser regulierenden Elemente *in vivo* darstellt, ist zur Zeit nicht bekannt.

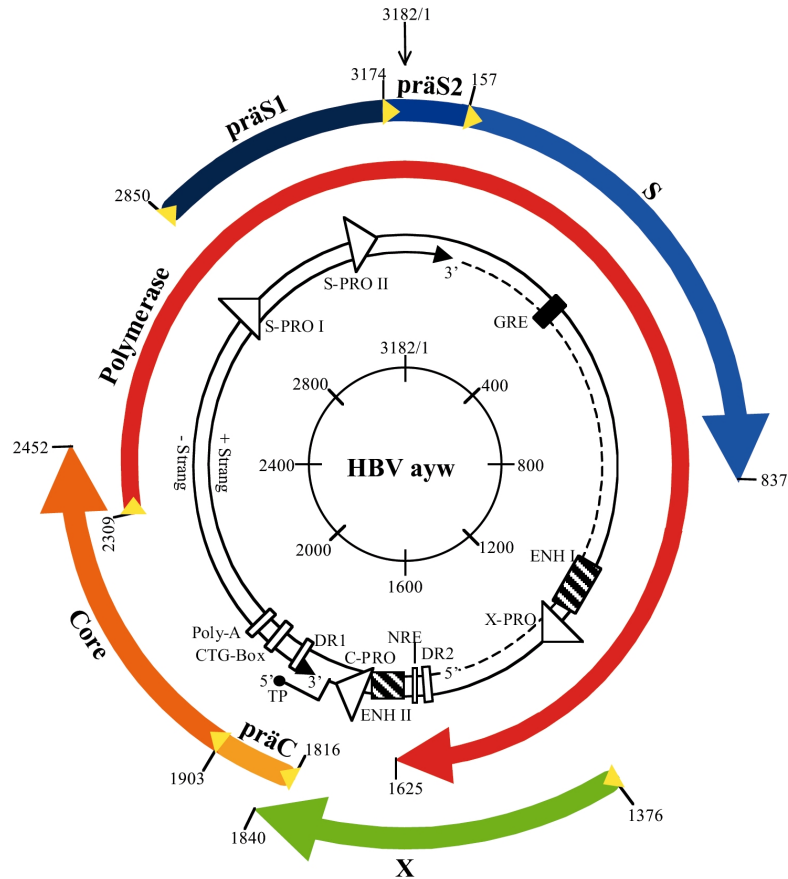


Abb. 2: Die Organisation des HBV-Genoms.

In der Mitte ist eine Nukleotidskala des HBV-Genoms (Subtyp ayw) dargestellt. Startpunkt der Nummerierung ist eine singuläre *EcoRI*-Schnittstelle. Das Genom ist ein partiell-doppelstängiges DNA-Genom. Während der Minusstrang vollständig ist, bleibt der Plusstrang unvollständig (gestrichelte Linie). Die Dreiecke markieren Promotor-Elemente (PRO) und die schraffierten Vierecke zeigen Enhancer-Elemente (ENH) an. Außen sind die vier offenen Leserahmen dargestellt (blau = Hüllproteine, rot = Polymerase, orange = C- und E-Proteine, grün = X-Protein). Die gelben Pfeile markieren jeweils Translationsstartstellen. Weitere Abkürzungen: DR = Sequenzwiederholung (direct repeat), GRE = glucocorticoid responsive element, NRE = negativ-regulierendes Element, Poly-A = Polyadenylierungssignal, CTG-Box = Verpackungssignal, TP = terminales Protein.

1.2 Replikation und Infektionszyklus

Da die Hepatozyten den primären Ort der viralen DNA-Replikation und damit der Vermehrung des Virus darstellen, liegt es nahe zu folgern, daß die Gewebsspezifität durch einen leberspezifischen Rezeptor bestimmt wird. Es hat sich jedoch gezeigt, daß der Hepatotropismus auch entscheidend auf der Ebene der Genexpression manifestiert wird. In

wie weit andere Zelltypen durch das Virus infiziert werden und welche Rolle dies im Krankheitsablauf spielt, ist zur Zeit strittig. Insgesamt sind die anfänglichen Schritte der HBV-Infektion, das heißt Adsorption an die Zellmembran (Abb. 3, (1)) und Penetration in die Zielzelle (2), noch schlecht charakterisiert. Der HBV-spezifische Rezeptor ist bis jetzt noch nicht bekannt. Dies liegt vor allem am Fehlen einer Zelllinie, die infizierbar ist und in der das Virus repliziert. Auf der internationalen HBV-Tagung 2001 wurde jedoch eine solche Zelllinie beschrieben (Gripon *et al.*, 2001). Dies gibt Anlaß zur Hoffnung, daß auch der HBV-Rezeptor in naher Zukunft identifiziert wird. Gegenwärtige Studien müssen sich auf den Gebrauch primärer humaner Hepatozyten beschränken (Gripon *et al.*, 1993; Galle *et al.*, 1994), die jedoch schlecht infizierbar und in Kultur sehr kurzlebig sind. Alternativ können klonierte HBV-Genome in humane Leberzelllinien (HepG2, Huh7) transfiziert werden, die nachfolgend eine Virusproduktion herbeiführen (Sureau *et al.*, 1986; Ochiya *et al.*, 1989). Diese Zelllinien binden auch das Virion und es konnte gezeigt werden, daß eine essentielle HBV-Rezeptor-Bindestelle innerhalb des großen Hüllproteins (Aminosäuren 21-47) lokalisiert ist (Neurath *et al.*, 1986; Pontisso *et al.*, 1989; Petit *et al.*, 1991; Dash *et al.*, 1992). Folglich kann auch eine Bindung des Virus an Hepatozyten durch spezifische monoklonale Antikörper inhibiert werden (Neurath *et al.*, 1986). Eine Reihe von Proteinen wurden bisher als HBV-Rezeptor vorgeschlagen (De Meyer *et al.*, 1997). Für keinen dieser Kandidaten, wie z.B. Interleukin-6-Rezeptor (Neurath *et al.*, 1992), Asialoglykoproteinrezeptor (Treichel *et al.*, 1994), IgA-Rezeptor (Pontisso *et al.*, 1992) oder die hepatozelluläre Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Petit *et al.*, 1992), konnte bisher jedoch die Rezeptorfunktion mit Sicherheit nachgewiesen werden.

Nach der Aufnahme des Virus in die Wirtszelle wird das Kapsid in das Zytosol entlassen (Qiao *et al.*, 1994). Die Bindung von Importinen (α/β) an ein C-terminales nukleäres Lokalisationssignal (NLS) innerhalb der Kapsidproteine (Yeh *et al.*, 1990; Eckhardt, *et al.*, 1991) führt zur Assoziation des Kapsids mit der Kernpore (Kann *et al.*, 1999). Nach dem „uncoating“, das heißt dem Zerfall des Kapsids, wird die virale DNA in das Kernlumen entlassen (Abb. 3, (3)). Hier wird der unvollständige Plusstrang des HBV-Genoms durch zelluläre Enzyme komplettiert und die Minusstrang-Lücke geschlossen (Abb. 3, (4)) (Kock und Schlicht, 1993). Weiterhin wird das kovalent-assoziierte P-Protein von der DNA gespalten. Es entsteht ein kovalent-geschlossenes, ringförmiges DNA-Molekül (cccDNA = covalently closed circular DNA). Infizierte Zellen enthalten mehrere Kopien der cccDNA im Kern (etwa 20 Moleküle pro Zelle), die als heterogene Population kleiner Chromosomen vorliegen (Newbold *et al.*, 1995).

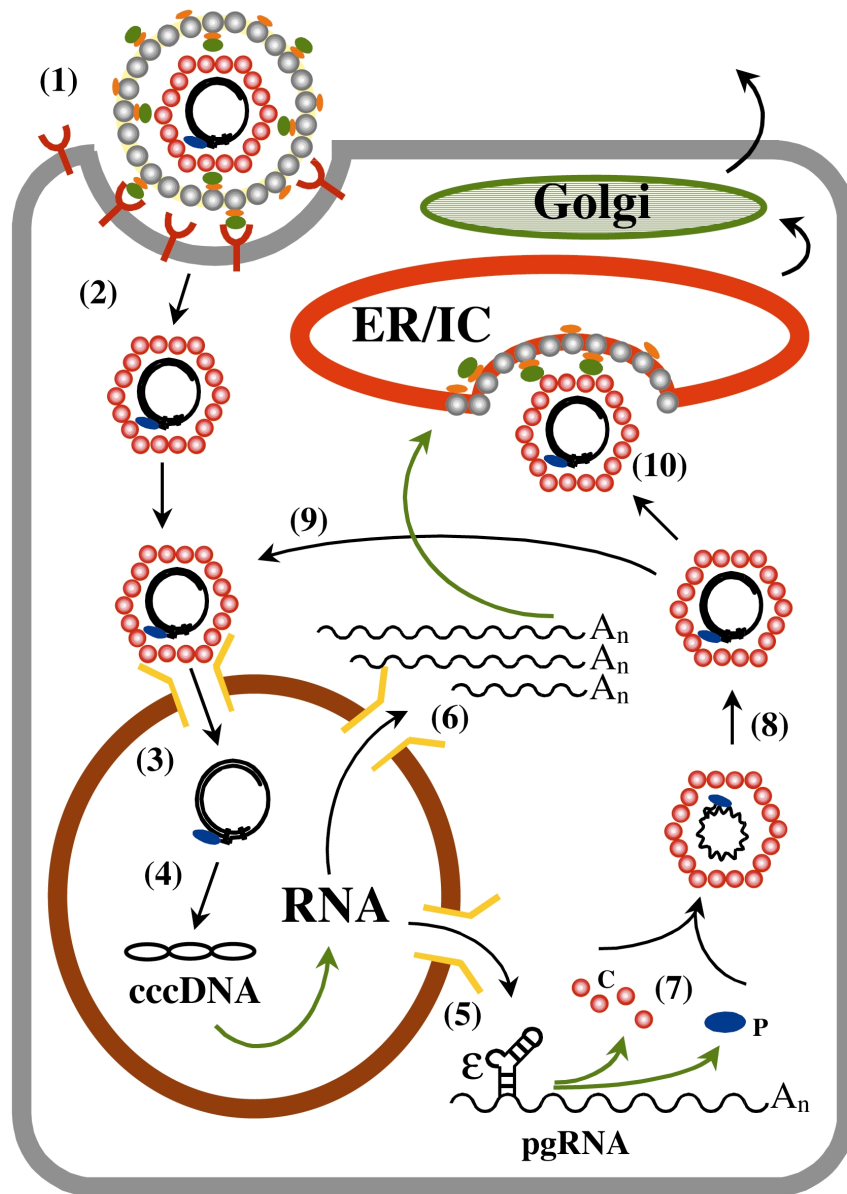


Abb. 3: Schematische Darstellung des Infektions- und Replikationszyklus von HBV.

Das Virus bindet an einen Rezeptor auf der Zellmembran (1) und penetriert die Zielzelle (2). Nach dem Freiwerden des viralen Kapsids interagiert dieses mit der Kernpore und entlässt die virale DNA in das Nukleoplasma (3). Hier wird der unvollständige Plusstrang des HBV-Genoms durch zelluläre Enzyme komplettiert und die Minusstrang-Lücke geschlossen (4). Es entsteht ein kovalent geschlossenes, doppelsträngiges DNA-Genom (cccDNA). Die cccDNA dient nachfolgend als Schablone für die Transkription aller viralen RNA-Moleküle, die in das Zytoplasma transportiert werden (5 und 6). Das prägenomische RNA-Molekül (pgRNA) dient als Schablone zur Translation des C- und P-Proteins (7). Ein spezifisches Verpackungssignal (ϵ) der pgRNA vermittelt die Umhüllung des Prägenoms. Innerhalb des Nukleokapsids erfolgt dann die reverse Transkription der prägenomischen RNA durch die virale Polymerase (8) und die virale DNA kann nachfolgend entweder nochmals in den Zellkern geschleust werden (9) oder von den Hüllproteinen verpackt werden (10). Die Viren verlassen die Zelle über den sekretorischen Weg. Schwarze Pfeile markieren Transportwege, grüne Pfeile kennzeichnen Syntheseschritte.

Die cccDNA dient nachfolgend als Schablone für die Transkription aller viralen RNA-Moleküle durch die wirtseigene RNA-Polymerase. Hierbei gibt es jedoch eine Besonderheit. Während DNA-Viren normalerweise von ihrem Genom mRNAs nur zur Synthese viraler Proteine transkribieren, die genomische DNA parallel dazu über DNA-Polymerasen replizieren und schließlich in Virusproteine verpacken, erfolgt die Replikation der HBV-DNA über eine RNA-Zwischenstufe (Abb. 3, (5)). Diese prägenomische RNA (pgRNA), die durch die zelluläre RNA-Polymerase II transkribiert wird, ist durch terminale Redundanz mit 3,5 kb länger als das eigentliche HBV-Genom (Enders *et al.*, 1985). Sie dient als Schablone zur reversen Transkription durch das virale P-Protein (Summers und Mason, 1982). Daneben werden über den präS1-, präS2/S- und X-Promotor drei subgenomische mRNA-Moleküle (2,4 kb, 2,1 kb und 0,7 kb) gebildet und in das Zytoplasma transportiert (Abb. 3, (6)). Alle viralen Transkripte besitzen eine „Kappe“ (cap), werden nicht gespleißt und werden an einer gemeinsamen Position innerhalb des C-Gens polyadenyliert, so daß sie ein gemeinsames 3'-Ende besitzen. Die prägenomische RNA besitzt unterschiedliche Funktionen. Sie wird einerseits im Zytoplasma zusammen mit der viralen Polymerase spezifisch in das neu entstehende Nukleokapsid verpackt und dient andererseits als Schablone zur Translation der präC-, C- und P-Proteine (Abb. 3, (7)). Das große Hüllprotein (L) wird von der 2,4 kb mRNA translatiert, das mittlere (M) und das kleine (S) Hüllprotein von der 2,1 kb mRNA. Das S-Protein kann jedoch auch vom 2,4 kb-Transkript translatiert werden (Cattaneo *et al.*, 1983). Die 0,7 kb mRNA dient als Matrize für das X-Protein.

Die Verpackung der pgRNA wird über ein spezifisches Verpackungssignal vermittelt. Das Signal besteht aus einer Sequenz am 5'-Ende der pgRNA, die als ϵ bezeichnet wird (etwa 100 Nukleotide) und eine Schleifenstruktur ausbildet (Junker-Niepmann *et al.*, 1990). Wegen der terminalen Redundanz der pgRNA befindet sich das ϵ -Signal an beiden Enden der genomischen RNA. Jedoch ist nur das ϵ -Signal am 5'-Ende funktionell aktiv. Dies scheint zu erklären, warum nur pgRNA verpackt wird, da auch die subgenomischen mRNAs an ihrem 3'-Ende ein ϵ -Signal besitzen. Die Verpackung des Genoms beginnt mit der kovalenten Bindung des P-Proteins an das ϵ -Signal. Dabei scheinen zelluläre Chaperone (Hsp90, Hsp70, p23) eine wichtige Rolle zu spielen (Hu und Seeger, 1996; Hu *et al.*, 1997). Danach erfolgt die Assoziation von C-Proteinen mit dem P- ϵ -Komplex und eine vollständige Umhüllung des Prägenoms. Der Ablauf dieses Prozesses ist noch weitgehend ungeklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß das C-Protein sich unabhängig von der pgRNA zu Kapsiden zusammenlagern kann (Roossinck *et al.*, 1986; Birnbaum und Nassal, 1990). Dabei erfolgt

der Zusammenbau über Dimer-Intermediate, die bei einer Schwellenkonzentration von etwa 1 μ M sich spontan zu Kapsiden zusammenlagern (Zhou *et al.*, 1992; Seifer *et al.*, 1993).

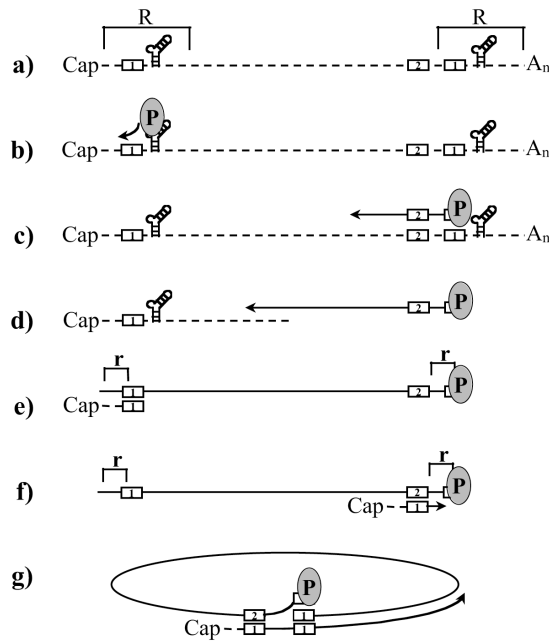


Abb. 4: Reverse Transkription des HBV-Genoms.

Die prägenomische RNA (pgRNA, gestrichelte Linie) besitzt am 5'-Ende ein "Cap" und ist am 3'-Ende polyadenyliert. Sie besitzt eine lange terminale Redundanz (R) und zwei Sequenzwiederholungsbereiche (DR1 und DR2, entsprechend nummerierte Rechtecke). Weiterhin besitzt sie zwei terminale ε-Signale. Die virale Polymerase (P) startet die reverse Transkription am 5'-ε-Signal und bildet eine Minusstrang-DNA von etwa 3-4 Nukleotiden (b). Dann werden P und die kovalent-assoziierte DNA zur 3'-Kopie von DR1 transloziert und die Minusstrangsynthese wird fortgeführt (c). Gleichzeitig wird die pgRNA durch die RNaseH-Aktivität von P abgebaut (d). Am 5'-Ende verbleibt jedoch ein RNA-Oligomer, bestehend aus einer kurzen terminalen Redundanz (r) und DR1 (e). Dieses Oligomer wird transloziert und lagert sich an DR2 an, wo es als Primer für die Plusstrangsynthese dient (f). Die Plusstrangsynthese schreitet zunächst bis zum 5'-Ende des Minusstrangs fort und beinhaltet somit r. Letztlich erfolgt eine Zirkularisierung, vermittelt durch r und den DR-Sequenzwiederholungen, so daß die Plusstrangsynthese fortgesetzt werden kann (g). Abbildung modifiziert nach Ganem (1996).

Innerhalb des Nukleokapsids erfolgt dann die reverse Transkription der prägenomischen RNA durch die virale Polymerase (Abb. 3, (8)). Essentiell für diesen Prozeß sind zwei 11 bp lange Sequenzwiederholungen, DR1 und DR2. DR1 befindet sich innerhalb des terminalen Redundanzbereiches (R), DR2 befindet sich etwa 200 Nukleotide abwärts von DR1 (Abb. 2). Das P-Protein initiiert die reverse Transkription am 5'-ε-Signal, indem die Seitenkette eines Tyrosinrestes innerhalb von P als Primer dient (Abb. 4, b) (Weber *et al.*, 1994; Zoulim und Seeger, 1994). Diese Initiation am ε-Signal erzeugt ein Oligonukleotid von etwa 4 Nukleotiden innerhalb von DR1 (Wang und Seeger, 1992). Daraufhin wird die Polymerase

und das kovalent-assoziierte DNA-Fragment zur 3'-Kopie von DR1 transloziert und es erfolgt die Elongation bis zum Ende der RNA-Schablone (Abb. 4, c). Es entsteht somit eine Minus-Strang DNA mit einer terminalen Redundanz von etwa 8 Nukleotiden, die als „r“ bezeichnet wird (Abb. 4, e). Während der Minus-Strang-Elongation wird die pgRNA durch die RNaseH-Aktivität des P-Proteins abgebaut, wobei ein Oligomer, bestehend aus r und DR1 erhalten bleibt (Abb. 4, d und e) (Summers und Mason, 1982; Radziwill *et al.*, 1990). Dieses RNA-Oligomer wird nachfolgend transloziert und lagert sich an DR2 an, wo die Plus-Strang-Synthese initiiert wird (Abb. 4, f) (Seeger *et al.*, 1986). Die Plus-Strang-Synthese verläuft bis zum 5'Ende der Minus-DNA-Schablone und beinhaltet somit den r-Bereich. Der r-Bereich des Plus-Strangs lagert sich schließlich an das r-Segment am 3'-Ende des Minus-Strangs an und bewirkt somit eine Zirkularisierung des Minus-Strangs (Abb. 4, g). Der Plus-Strang kann nun weiter synthetisiert werden, wobei die Elongation jedoch vor Erreichen des Endes abbricht. Dadurch bleibt das Genom nur partiell doppelsträngig, eine Besonderheit der Hepadnaviren. Zytoplasmatische Nukleokapside, welche die reife Virus-DNA beinhalten, assoziieren im Anfangsstadium der Infektion wiederum mit der Kernpore und entlassen ihre DNA in das Kernlumen (Abb. 3, (9)). Dadurch entsteht zunächst eine Anhäufung der cccDNA, wodurch eine stabile Infektion der Zielzelle erreicht wird (Tuttleman *et al.*, 1986). Erst im späteren Ablauf der Infektion werden auch die Hüllproteine synthetisiert, die dann eine Verpackung der Nukleokapside herbeiführen (Abb. 3, (10)). Reife Viren werden dann von der infizierten Zelle sezerniert, was zur Ausbreitung des Virus im Gewebe führt.

2. Die HBV-Hüllproteine und ihre Rolle bei der Virusmorphogenese

Wie oben dargelegt, werden alle HBV-Hüllproteine von einem offenen Leserahmen kodiert. Drei unterschiedliche Startstellen und ein gemeinsames Stopkodon führen dazu, daß die Hüllproteine einen einheitlichen C-Terminus besitzen. Folglich findet sich die Sequenz des S-Proteins (226 Aminosäuren (AS)) auch am C-Terminus des M- und L-Proteins wieder (Abb. 5). Das M-Protein besitzt eine N-terminale Extension von 55 Aminosäuren, die als präS2-Region bezeichnet wird, während das L-Protein N-terminal nochmals um 108 Aminosäuren (Subtyp ayw) vergrößert ist. Diese Domäne wird als präS1-Region bezeichnet. PräS1 und präS2 zusammen bilden die präS-Region des L-Proteins (Heermann *et al.*, 1984).

Die drei Hüllproteine werden als polytope Transmembranproteine an der Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER) synthetisiert (Eble *et al.*, 1986; Eble *et al.*, 1990). Die Integration in die ER-Membran erfolgt mittels hydrophober Transmembranregionen innerhalb der S-Domäne. Sequenzanalysen des S-Proteins wiesen drei hydrophobe Regionen auf (AS 8-28, AS 79-100 und AS 160-220), die durch zwei hydrophile Bereiche getrennt sind (Stirk, *et al.*, 1992). Mutationsanalysen wiesen nach, daß die beiden N-terminalen hydrophoben Domänen die Membraninsertion und die Topologie des S-Proteins bestimmen (Eble *et al.*, 1987; Bruss und Ganem, 1991a; Prange *et al.*, 1992). Die Anlagerung an die ER-Membran wird durch das erste hydrophobe Segment (Signal I) vermittelt. Signal I stellt eine interne Signal-Anker-Sequenz dar. Die zweite hydrophobe Region (Signal II) ist ein komplexes topogenes Element, welches das Protein in der Membran verankert und gleichzeitig eine Translokation C-terminaler Bereiche in das ER-Lumen herbeiführt. Folglich ist die erste hydrophile Schleife (zwischen Signal I und II) im Zytoplasma lokalisiert (entspricht dem Virusinneren), während die zweite hydrophile Schleife in das ER-Lumen ragt (entspricht der Virusoberfläche) (Abb. 6) (Stirk, *et al.*, 1992). Das Modell dieser Topologie wird durch den Gebrauch potentieller N-Glykosylierungsstellen unterstützt. Während die Konsensussequenz (Asn-His-Ser, AS 59-61) innerhalb der ersten Schleife nicht modifiziert wird, findet eine N-Glykosylierung an Position AS 146 innerhalb der zweiten Schleife statt (Asn-Cys-Thr, AS 146-148). Modifiziert wird jedoch nur etwa die Hälfte der S-Moleküle (Heermann *et al.*, 1984; Patzer *et al.*, 1984). Die Transmembranstruktur des C-terminalen hydrophoben Bereiches wurde experimentell noch nicht untersucht. Aufgrund von Computer-unterstützter Strukturanalysen wurden jedoch zwei α -helikale Transmembrandomänen vorhergesagt, so

daß neben dem N-Terminus auch der C-Terminus in das ER-Lumen ragt (Abb. 6) (Berting *et al.*, 1995).

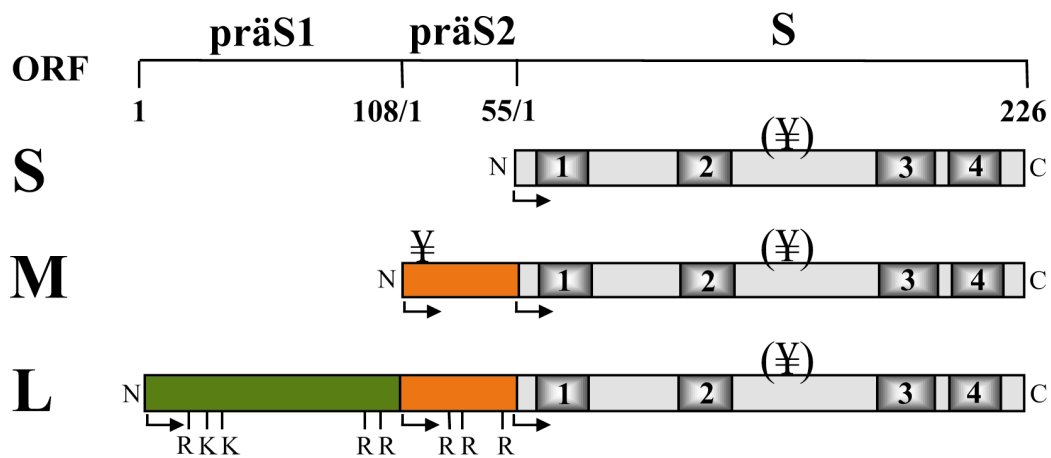


Abb. 5: Struktureller Aufbau der HBV-Hüllproteine.

Das große (L), mittlere (M) und kleine (S) Hüllprotein werden von einem einzigen offenen Leserahmen (ORF) kodiert. Die Translation erfolgt von drei unterschiedlichen Startstellen (Pfeile), die im gleichen Leseraster liegen. Die HBV-Hüllproteine stellen koterminale Proteine dar, d.h. sie besitzen eine einheitliche C-terminale Aminosäuresequenz, wobei es sich hierbei um die Sequenz des S-Proteins handelt (grau). Das S-Protein umfaßt 226 Aminosäuren und wird partiell N-glykosyliert (¥). Weiterhin wurden für das S-Protein vier Transmembrandomänen vorgeschlagen (entsprechend nummerierte Rechtecke). Das M-Protein weist gegenüber dem S-Protein eine N-terminale Erweiterung von 55 Aminosäuren auf, die als präS2-Domäne bezeichnet wird. Die präS2-Domäne von M wird N-glykosyliert (¥). Das L-Protein weist zusätzlich zu präS2 eine N-terminale Erweiterung von 108 Aminosäuren (Subtyp ayw) auf, die als präS1-Domäne bezeichnet wird. Für die präS-Region des L-Proteins sind potentielle Trypsinspaltstellen angezeigt (R = Arginin, K = Lysin).

Im Gegensatz zur S-Domäne besitzt der präS-Bereich keine Signalsequenzen (Eble *et al.*, 1990; Ostapchuk *et al.*, 1994). Daher werden sowohl das M- als auch das L-Protein mittels der Signalsequenzen innerhalb der S-Region in die ER-Membran inseriert. Im Fall des M-Proteins führt dies zu einer kotranslationalen Translokation der präS2-Domäne in das ER-Lumen, wodurch eine S-ähnliche Topologie entsteht (Abb. 6). Die präS2-Domäne wird während ihrer kotranslationalen Translokation am Asparaginrest der Aminosäureposition 4 (Asn4) N-glykosyliert. In der viralen Hülle finden sich folglich M-Proteine, die einfachglykosyliert sind (Asn4) und solche, die durch partielle Glykosylierung an Asn146 innerhalb der S-Region, zweifach N-glykosyliert sind. Die N-glykosylierte präS2-Region interagiert im Lumen des ER mit dem zellulären Chaperon Calnexin (Werr und Prange, 1998). Das M-Protein wird zusätzlich innerhalb des Serin/Threonin-reichen Bereiches zwischen Aminosäuren 27 und 47 O-glykosyliert (Werr und Prange, 1998).

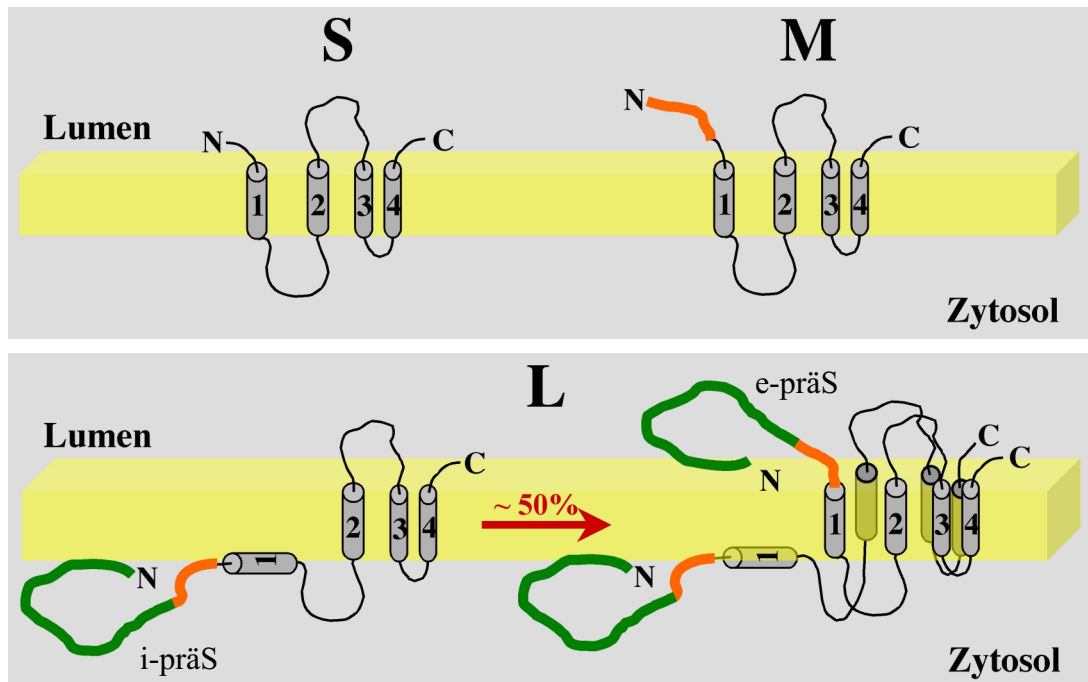


Abb. 6: Die transmembrane Topologie der HBV-Hüllproteine in der ER-Membran.

Im oberen Teil der Abbildung sind Modelle der S- und M-Topologie dargestellt. Die vier Transmembrandomänen des S-Proteins (1-4) verankern das Protein in der Membran. N- und C-Terminus weisen in das Lumen des ER. Die präS2-Domäne des M-Proteins (orange) wird kotranslational in das ER-Lumen transloziert. Das L-Protein (im unteren Teil der Abbildung) wird ebenfalls durch die Transmembrandomänen innerhalb seiner S-Region in der ER-Membran verankert. Nach der Synthese ist seine präS1- (grün) und präS2-Region (orange) zunächst zytoplasmatisch orientiert (links). In einem Reifungsprozeß transloziert dann etwa die Hälfte der L-Moleküle die präS-Domäne posttranslational zur luminalen Seite der Membran. Das L-Protein besitzt folglich im reifen Zustand eine duale Topologie.

Im Gegensatz zu M und S besitzt das L-Protein eine außergewöhnliche duale Membrantopologie, da seine N-terminale präS-Domäne sowohl außerhalb, als auch innerhalb der viralen Hüllmembran lokalisiert ist (Bruss *et al.*, 1994; Ostapchuk *et al.*, 1994; Prange und Streeck, 1995). Die ungewöhnliche duale L-Topologie wird durch einen bisher noch nicht verstandenen Prozeß partieller, posttranslationaler präS-Translokation über intrazelluläre Membranen erreicht. Das heißt, zum Zeitpunkt der Synthese und der Membranintegration befindet sich die präS-Region innerhalb des Zytosols (Abb. 6, i-präS = interne Orientierung). Erst im Laufe der Zeit transloziert etwa die Hälfte der L-Moleküle die präS-Domäne posttranslational durch die Membran (Abb. 6, e-präS = externe Orientierung). Die duale Topologie von L wird auch in der Hülle sezernierter Viren beibehalten und erlaubt es dem L-Protein, multiple Funktionen auszuüben. Während die i-präS-Form für die Umhüllung der Nukleokapside essentiell ist (Bruss und Vieluf, 1995), ist die externe präS-Orientierung (e-präS) an der Bindung des Rezeptors auf der Hepatozytenoberfläche beteiligt (Neurath *et al.*, 1986). Da die Translokation der präS-Domäne des L-Proteins posttranslational erfolgt, wird

keine der beiden potentiellen N-Glykosylierungsstellen (Asn4 in präS1 und Asn4 in präS2) der präS-Region modifiziert. L wird ähnlich wie das S-Protein partiell innerhalb der S-Domäne glykosyliert, so daß nichtglykosylierte und einfachglykosylierte L-Proteine in der Virushülle vorkommen. Die präS1-Region wird zusätzlich kotranslational durch Anheftung einer Myristinsäure an Aminosäureposition 2 (Gly2) modifiziert (Persing *et al.*, 1987). Die Myristylierung bewirkt eine Assoziation der präS-Region mit der ER-Membran, besitzt jedoch keinen Einfluß auf die duale Topologie von L (Prange und Streeck, 1995). Zur Ausbildung der dualen Topologie von L sind keine anderen viralen Komponenten notwendig (Prange und Streeck, 1995). Jedoch führt eine Deletion des Aminosäurebereiches 70 bis 94 innerhalb der präS1-Region von L zu einer kotranslationalen präS-Translokation und folglich zu einer einheitlichen externen Orientierung (Prange und Streeck, 1995; Löffler-Mary *et al.*, 1997). *In vitro*-Studien konnten zeigen, daß diese präS1-Sequenz spezifisch mit dem zytosolischen Chaperon Hsc70 interagiert (Löffler-Mary *et al.*, 1997). Ob Hsc70 eine Rolle bei der posttranslationalen präS-Translokation spielt, ist noch offen. Ein Modell, das aufgrund von Computeranalysen zur Struktur des S-Proteins postuliert wurde, erklärt den eigentümlichen Translokationsmechanismus von L mittels eines hydrophilen Transmembrankanals, der durch Dimerisierung der amphipathischen Transmembrandomänen 1, 3 und 4 der S-Region gebildet wird (Berting *et al.*, 1995). Unterstützt wird dieses Modell durch den Befund, daß die Hüllproteine innerhalb des ER sowohl Homo- als auch Heterodimere ausbilden (Wunderlich und Bruss, 1996) und sich mittels Disulfidbrücken weiter zu Oligomeren zusammenlagern können (Huovila *et al.*, 1992; Mangold und Streeck, 1993; Mangold *et al.*, 1997).

Bei der Virusmorphogenese übt das L-Protein essentielle Funktionen aus. Wie oben dargelegt, ist es entscheidend an der Interaktion mit dem viralen Kapsid und der damit verbundenen Verpackung beteiligt. Mutationsanalysen konnten zeigen, daß eine kurze C-terminale Sequenz innerhalb der präS1-Region (AS 92-108) und ein N-terminaler Bereich der präS2-Domäne (AS 1-5) für die Kapsidverpackung und die damit verbundene Virusentstehung essentiell sind (Bruss und Thomssen, 1994; Bruss und Vieluf, 1995; Bruss, 1997; Le Seyec *et al.*, 1998). *In vitro*-Bindungsstudien konnten weiterhin eine Sequenz innerhalb der ersten zytosolischen Schleife der S-Region (AS 56-80) als potentielle Interaktionsregion mit dem Kapsid identifizieren (Poisson *et al.*, 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das S-Protein neben L für die Virusmorphogenese benötigt wird (Bruss und Ganem, 1991b; Ueda *et al.*, 1991), und daß es neben L beim Verpackungsprozeß beteiligt ist (Löffler-Mary *et al.*, 2000). Informationen über den intrazellulären Ort, sowie über die

Mechanismen der eigentlichen Umhüllung und Knospung der Viren sind bisher nur in unzureichendem Maße vorhanden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen legen nahe, daß die Knospung an der ER-Membran stattfindet (Kamimura *et al.*, 1981; Roingeard *et al.*, 1990).

Das M-Protein scheint sowohl für die Virusbildung als auch für die Infektion entbehrlich zu sein (Bruss und Ganem, 1991b; Santantonio *et al.*, 1992; Fernholz *et al.*, 1993). Folglich finden sich im Verlauf von Infektionen, die mit Interferon (INF) behandelt werden, häufig HBV-Varianten mit Defekten in der M-Proteinexpression, welche als alleinige Viruspopulation persistieren können (Gerken *et al.*, 1991; Santantonio *et al.*, 1992; Fernholz *et al.*, 1993; Gerner *et al.*, 1998). Welche Rolle das M-Protein im Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus spielt, ist zur Zeit offen.

3. Die Biogenese von Membranproteinen

Wie oben dargelegt, wird das L-Protein am Translokon der ER-Membran synthetisiert. Bei der Ausbildung seiner Struktur spielen sowohl kotranslationale als auch posttranslationale Prozesse eine Rolle (Prange und Streeck, 1995). Diese werden mittels unterschiedlichster topogener Signale gesteuert. Um die Grundlagen der unterschiedlichen Mechanismen verstehen zu können, soll nachfolgend kurz das Translokon selbst und seine Funktionsweise vorgestellt werden. Eine ausführliche Übersicht bieten die Artikel von Johnson und van Waes (1999) und Matlack und Mitarbeitern (1998).

3.1 Die Struktur des Translokons und seiner Komponenten

Schon im Jahr 1975 haben Günther Blobel und Bernhard Dobberstein die Hypothese aufgestellt, daß sekretorische Proteine eukaryotischer Zellen durch einen wäßrigen Kanal, bestehend aus integralen Membranproteinen, innerhalb der ER-Membran transloziert werden (Blobel und Dobberstein, 1975a; Blobel und Dobberstein, 1975b). Doch erst 16 Jahre später wurde diese Hypothese bewiesen (Simon und Blobel, 1991). Der Begriff „Translokon“ als Ort, an dem Translokation und Integration von Membranproteinen stattfinden, wurde 1986 von Walter und Lingappa (1986) geprägt. Es zeigte sich nachfolgend, daß dieser Kanal aus einem Kernkomplex besteht, der von drei unterschiedlichen Proteinen aufgebaut wird (Sec61 α , Sec61 β , Sec61 γ). Sec61 α besitzt eine molekulare Masse von etwa 40 kDa und weist zehn Membrandurchgänge auf, während Sec61 β und Sec61 γ eine Größe von 12,

beziehungsweise 10 kDa besitzen und jeweils nur ein C-terminales Transmembransegment beinhalten (Görlich *et al.*, 1992b; Görlich und Rapoport, 1993). Im Translokons sind zwei oder drei Sec61-Trimere vereint (Hanein *et al.*, 1996; Beckmann *et al.*, 1997; Wang und Dobberstein, 1999). Weiterhin gehört zu diesem Kernkomplex des Translokons das TRAM-Glykoprotein, welches die Membran wenigstens sechsfach durchspannt. Mit diesen Komponenten kann *in vitro* eine Proteintranslokation rekonstituiert werden, weshalb sie zum sogenannten Kernkomplex gezählt werden (Görlich und Rapoport, 1993). Eine Reihe weiterer Proteine sind mit dem Translokons assoziiert. Dazu zählen der Signalpeptidase-Komplex (SPC), bestehend aus fünf Untereinheiten (Evans *et al.*, 1986), der Oligosaccharyl-Transferase-Komplex (OST), bestehend aus wenigstens sieben Untereinheiten (Reiss *et al.*, 1997), das Ribosom-assoziierte Membranprotein (RAMP4) und der Translokons-assoziierte Membran-Komplex (TRAP, zuvor SR = signal recognition particle (SRP) receptor), bestehend aus vier Untereinheiten (Hartmann *et al.*, 1993).

Kreuzvernetzungsstudien (cross-linking) haben nahe gelegt, daß das Innere der Pore wesentlich durch Sec61 α ausgekleidet wird (High *et al.*, 1993; Mothes *et al.*, 1994). Auch TRAM besitzt Kontakt zum Innenraum der Pore, wobei nicht klar ist, ob dieser Kontakt permanenter, oder transienter Natur ist (Krieg *et al.*, 1989; Görlich *et al.*, 1992a). Dem TRAM-Protein wurde weiterhin eine Rolle bei der Erkennung von Transmembrandomänen und deren Integration in die Membran zugeschrieben (Do *et al.*, 1996). Während der Proteintranslokation beträgt der Porendurchmesser des Translokons 40-60 Å (Hamman *et al.*, 1997) und der äußere Durchmesser etwa 110 Å (Hanein *et al.*, 1996; Beckmann *et al.*, 1997). Nach Beendigung der Translokation und dem Ablösen des Ribosoms beträgt der innere Durchmesser nur 9-15 Å, wobei der äußere Durchmesser nahezu unverändert bleibt (Hamman *et al.*, 1998). Die Existenz einer Pore mit solcher Größe wirft die Frage auf, wie die ER-Membran als Permeabilitätsbarriere erhalten bleibt. Es zeigte sich, daß während der Translokation eines Proteins das Ribosom einen dichten Verschluss der Pore gewährleistet (Crowley *et al.*, 1994). Nach dem Ablösen des Ribosoms scheint das Translokons wesentlich durch das Chaperon BiP verschlossen zu werden, das im Lumen des ER lokalisiert ist (Hamman *et al.*, 1998). Das Translokons ist folglich auch im nichtfunktionellen Zustand als Einheit erhalten. Über den Zusammenbau und die Regulation des Translokons ist bisher wenig bekannt. Es wurde beschrieben, daß Sec61 α kotranslational in die ER-Membran eingelagert wird (Knight und High, 1998). Weiterhin ist bekannt, daß TRAM als auch Sec61 β phosphoryliert werden (Gruss *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung ist Calcium-abhängig und spielt möglicherweise eine Rolle bei der Regulation des Translokons. Warum die

Komponenten des Translokons nicht sezerniert werden (sie besitzen keine bisher bekannten ER-Retensionssignale), ist offen. Sec61-Komponenten konnten kürzlich auch im Intermediären Kompartiment (IC) nachgewiesen werden (Greenfield und High, 1999).

In Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde beobachtet, daß Proteine auch posttranslational in das ER-Lumen transportiert werden können (Hansen und Walter, 1988; Brodsky *et al.*, 1995). Es zeigte sich, daß diese posttranslationale Translokation mit Hilfe eines heptameren Sec-Komplexes erreicht wird. Dieser Komplex besteht aus Sec61p (Sec61 α , Sec61 β und Sec61 γ) und dem Sec62-Sec63-Komplex, der wiederum aus vier Polypeptiden (Sec62p, Sec63p, Sec71p und Sec72p) aufgebaut ist (Panzner *et al.*, 1995). In Gegenwart des luminalen Chaperons Kar2p (BiP) ist dieser Komplex ausreichend, um *in vitro* eine posttranslationale Proteintranslokation durchzuführen. Sec62p durchspannt die Membran zweifach, Sec63p dreifach. Sie besitzen beide ausgedehnte C-terminale, zytoplasmatische Domänen. Sec71p ist ein Glykoprotein mit einer Transmembrandomäne, während Sec72p peripher mit der Membran assoziiert ist (Corsi und Schekman, 1996; Rapoport *et al.*, 1996; Matlack *et al.*, 1998). Sec63p beinhaltet eine sogenannte DnaJ-Homologie-Domäne, die im ER-Lumen für die Interaktion mit Kar2p verantwortlich ist (Sadler *et al.*, 1989).

Zusammenfassend zeigen die beschriebenen Befunde, daß das Translokon der ER-Membran ein hochmolekularer Proteinkomplex aus multiplen Untereinheiten ist, der eine regulierbare Transmembranpore ausbildet.

3.2 Translokation und Integration an der Membran des Endoplasmatischen Reticulums

Wie oben dargelegt, beginnt die Synthese des HBV L-Proteins mit der kotranslationalen Integration seiner S-Domäne in die ER-Membran. Ähnlich wie bei anderen Membranproteinen startet die Synthese zunächst an freien Ribosomen im Zytosol. Erst die Translation einer Signalsequenz führt zur Bindung eines Signal-Erkennungs-Partikels (SRP = signal recognition particle), der durch die Interaktion mit seinem spezifischen Rezeptor auf der ER-Membran (TRAP/SR, s.o.) die Bindung des Ribosoms an das Translokon herstellt (Walter und Johnson, 1994). Nach dieser Bindung befindet sich die Proteinkette in einem wäßrigen „Kompartiment“, das weder vom Zytosol noch vom ER-Lumen her zugänglich ist (Crowley *et al.*, 1994; Hamman *et al.*, 1998). BiP öffnet das Translokon innerhalb des Lumens bei einer Kettenlänge von etwa 70 Aminosäuren (Crowley *et al.*, 1994), und das Poreninnere vergrößert sich. Das Protein wird nachfolgend aus dem Ribosom durch das Translokon, in das ER-Lumen synthetisiert und transportiert. Membrandomänen eines

4. Zielsetzung

Im Mittelpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit stand das große (L) Hüllprotein des Hepatitis-B-Virus und seine außergewöhnliche duale Topologie, die mittels partieller posttranslationaler präS-Translokation entsteht. Die Orientierung der präS-Region sowohl im Zytosol als auch im ER-Lumen, spielt eine Schlüsselrolle bei der Virusmorphogenese von HBV, da sie nicht nur für die Bildung infektiöser Viren, sondern auch für die Aufnahme des Virus in die Leberzelle essentiell ist. Der Mechanismus der partiellen posttranslationalen präS-Translokation des L-Proteins blieb bisher jedoch noch völlig unverstanden. Ebenso war auch das intrazelluläre Kompartiment, an dem die präS-Reorientierung stattfindet, nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollten folglich sowohl die intrazelluläre Lokalisation als auch der Mechanismus der posttranslationalen präS-Translokation des L-Proteins charakterisiert werden. Als Ansatzpunkt diente zunächst die Hypothese eines HBV-spezifischen Transmembrankanals, der möglicherweise durch Oligomerisierung des S-Proteins entstehen könnte (Berting *et al.*, 1995; Stirk *et al.*, 1992). Es sollte geklärt werden, ob S- und eventuell M-Hüllproteine für die Translokation der präS-Domäne des L-Proteins benötigt werden. Um den Mechanismus der Translokation besser zu verstehen, sollten strukturelle Determinanten des L-Proteins, die wesentlich die Ausbildung der dualen Topologie beeinflussen, mittels Mutagenese entschlüsselt werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob möglicherweise wirtseigene Komponenten an der Translokation der präS-Domäne beteiligt sind. Da der Prozeß der posttranslationalen präS-Translokation *in vitro* bisher nicht rekonstituiert werden konnte, sollte letztlich versucht werden, ein System etablieren, das eine präS-Translokation *in vitro* ermöglicht.

II. Material und Methoden

1. Material

In der vorliegenden Arbeit wurde der HBV-Subtyp *ayw* verwendet. Die Nummerierung der Nukleotidsequenz erfolgt nach Galibert *et al.* (1979), wobei die singuläre *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle des HBV-Genoms als Nummerierungsstartpunkt dient.

1.1 Zelllinien

Prokaryonten:

- *Escherichia coli*, DH5 α , ATCC 53868

Eukaryonten:

- COS7, Nierentumorzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze, ATCC CRL-1651

1.2 Plasmide

Zur transienten Proteinexpression in Säugerzellen wurde das L-Gen in das Plasmid pNI2 (Israel *et al.*, 1989) kloniert (pNI2.L) (Prange *et al.*, 1991). Dieses Konstrukt diente als Grundlage zur Herstellung unterschiedlicher L-Mutanten. Die Transkription der jeweiligen Konstrukte steht unter der Kontrolle des humanen Metallothionein-IIa- (hMTIIa-) Promotors.

- **pNI2.L_{HA}** : Das HBV L-Gen wurde am 3'-Ende mit einem Influenzavirus Hämagglutinin- (HA-) Epitop (YPYDVDPDYASL) markiert (Lambert und Prange, 2001).
- **pNI2.L/*NdeI*_{HA}** : Um nachfolgende Klonierungsschritte zu erleichtern, wurde an Position nt 830 eine *NdeI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Mittels PCR wurden vom Plasmid pNI2.L_{HA} zwei Fragmente amplifiziert (Fragment A mit dem 5'-Primer: 5'-GTGAGAGGCCTGTATTTCCCTGCTGGTGGCTCCAGT-3' und dem 3'-Primer: 5'-GGGTACATATGTACCCAAAGACAAAAGAAAATTGG-3'; Fragment B mit dem 5'-Primer: 5'-GGGTACATATGTACCCATACGATGTTCC-3' und dem 3'-Primer: 5'-CCAAACTCATCAATGTATCTTATCATG-3'), welche nach *NdeI*-Verdau ligiert wurden (die *NdeI*-Erkennungssequenz ist jeweils unterstrichen). Dieses Fragment wurde verwendet, um das *XhoI-NheI*-Wildtyp-Fragment in pNI2.L_{HA} zu ersetzen.
- **pNI2.L_{oHA}** : Um die gleichzeitige Expression der HBV M- und S-Hüllproteine im offenen Leserahmen (ORF) von L zu unterbinden, wurden die entsprechenden Startkodons (Met¹⁰⁹ und Met¹⁶⁴) mutiert. Durch M13-Mutagenese wurde anstelle der Aminosäure Methionin

jeweils ein Threonin eingefügt (Löffler-Mary *et al.*, 2000). Diese Situation findet sich auch bei allen weiteren L_o- (L"only"-)Konstrukten.

- **pNI2.LΔTM1_{HA}** : Deletion der Transmembrandomäne TM1 (nt 180 – 249) (Lambert und Prange, 2001).
- **pNI2.LΔTM2_{HA}** : Deletion der Transmembrandomäne TM2 (nt 395 – 450) (Lambert und Prange, 2001).
- **pNI2.LΔTM3/4_{HA}** : Deletion der Transmembrandomänen TM3 und TM4 (nt 491 - 830) (Lambert und Prange, 2001).
- **pNI2.LoΔTM3/4ΔSau_{HA}** : Zusätzliche Deletion des *Sau*-Fragmentes (nt 3052 - 3166) (Prange und Streeck, 1995).
- **pNI2.LΔTM2/3/4_{HA}** : Deletion der Transmembrandomänen TM2, TM3 und TM4 (nt 387 - 830) (Lambert und Prange, 2001).
- **pNI2.LΔTM1/3/4_{HA}** : Deletion der Transmembrandomänen TM1, TM3 und TM4 (nt 180 - 249 und nt 491 - 830) (Lambert und Prange, 2001).
- **pNI2.LoΔTM1/3/4_{HA}** : Mit dem 5'-Primer: 5'-CCTCCTCCAAGTCCCAGCGAACCC-3' und dem 3'-Primer: 5'-GTTCTCCATGTTCTTGGCCAGGG-3' wurden vom Plasmid pNI2.Lo_{HA} das entsprechende Fragment amplifiziert und ein *MscI*-Verdau durchgeführt. Dieses ersetzte dann das *MscI*-Fragment im Plasmid pNI2.LΔTM1/3/4_{HA}, so daß folglich nt 150-305 und nt 491-830 deletiert sind.
- **pNI2.LΔ150-163_{HA}** : Deletion von nt 115-156 innerhalb der präS2-Region. Mittels PCR wurden vom Plasmid pNI2.L_{HA} zwei Fragmente amplifiziert (Fragment A mit dem 5'-Primer: 5'-CCTCCTCCAAGTCCCAGCGAACCC-3' und dem 3'-Primer: 5'-GAAGATTGACGACCATATGAGAGGCAG-3'; Fragment B mit dem 5'-Primer: 5'-GACCCTGCGCTGCCATATGGAGAAC-3' und dem 3'-Primer: 5'-CCAATCAATAGGCCTGTTAATAGG-3'), die nach *NdeI*-Verdau ligiert wurden (die *NdeI*-Erkennungssequenz ist jeweils unterstrichen). Mit dem neuen Konstrukt wurde das *XmaI-NheI*-Fragment in pNI2.L_{HA} ersetzt.
- **pNI2.L::MHV_{HA}** : Ein chimäres Konstrukt, bestehend aus der HBV präS-Domäne und den ersten beiden Transmembrandomänen des M-Hüllproteins des Coronavirus Mausepithelitis-Virus (MHV-A59) (Lambert und Prange, 2001).
- **pNI2.präS(d)S(h)_{HA}** : Ein chimäres Konstrukt, bestehend aus der DHBV präS-Domäne und der HBV S-Region. Diese Mutante entstand, indem das *SmaI-XbaI*-Fragment aus pNI2.L_{HA} durch das *HindIII-XbaI*-Fragment aus pSVD-H (Gerhardt und Bruss, 1995) ersetzt wurde.

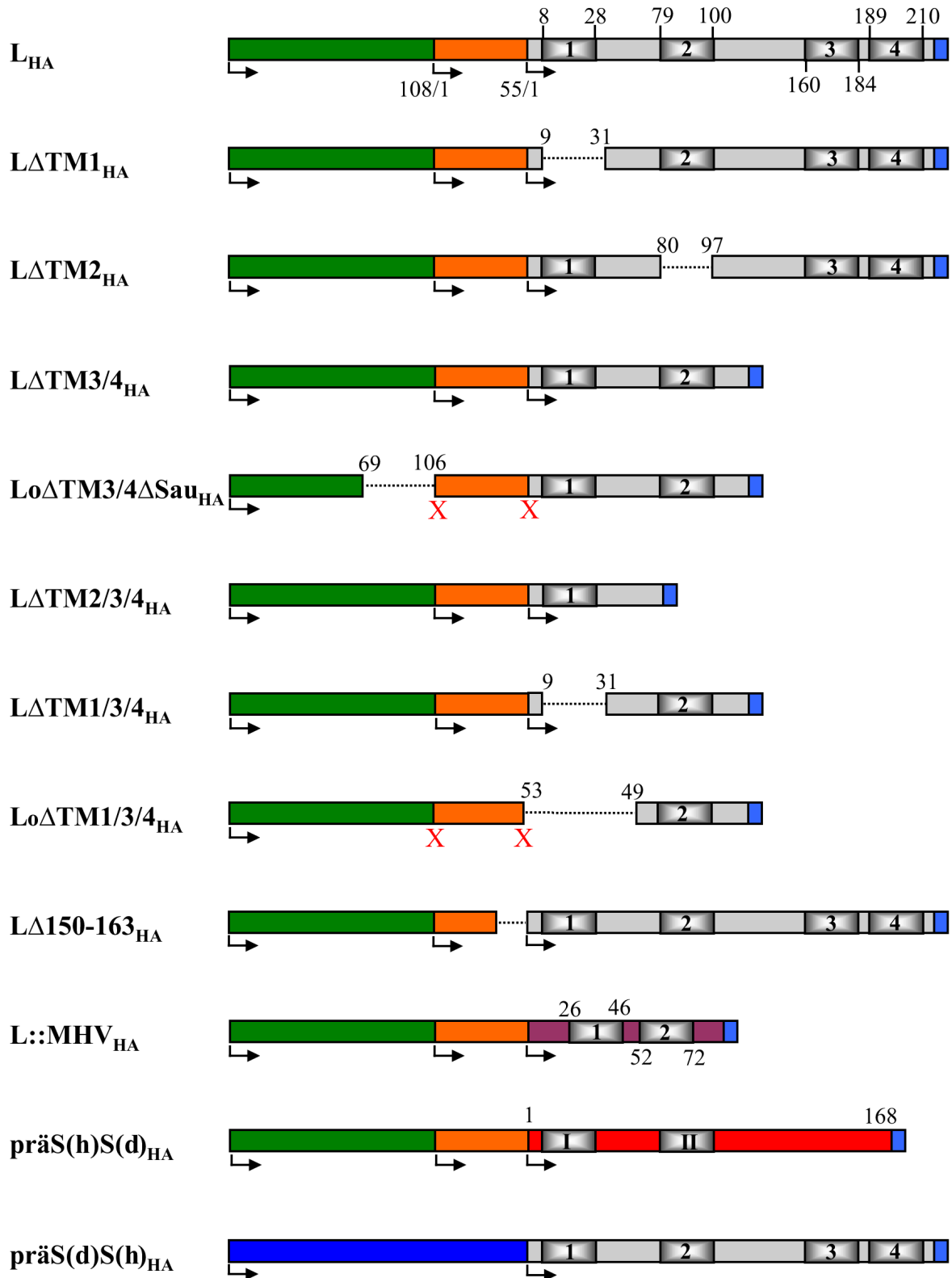


Abb. 7: Schematische Darstellung der konstruierten HBV L-Mutanten.

Die unterschiedlichen Domänen der Proteine sind farblich unterschiedlich dargestellt. Die präS1-Region ist grün, die präS2-Region ist orange und die S-Region ist grau dargestellt. Transmembrandomänen sind als Vierecke innerhalb der S-Region gezeigt. Alle Proteine besitzen ein C-terminales HA-Epitop (hellblau). In rot ist die DHBV S-Region dargestellt und in dunkelblau die DHBV präS-Domäne. Die Pfeile markieren Translationsstartstellen; ein rotes X zeigt eine Mutation dieser Startstelle an. Die Zahlen über- und unterhalb der Schemata geben die Aminosäureposition der entsprechenden Bereiche an. Dabei wird jede der drei Domänen mit "1" beginnend nummeriert.

- **pNI2.präS(h)S(d)_{HA}** : Ein chimäres Konstrukt, bestehend aus der HBV präS-Domäne und der DHBV S-Region. Mittels PCR (5'-Primer: 5'-CCACTGAGAAAGCATATG TCTGGT-3'; 3'-Primer: 5'-TTCTTATTCCATATGCTTGTA AAA-3') wurde aus dem DHBV26-Genom (Mandart *et al.*, 1984) ein Fragment amplifiziert, das nach *NdeI*-Verdau in die *NdeI*-Schnittstelle von pNI2.präS_{HA} kloniert wurde.
- **pNI2.präS_{HA}** : Durch PCR (5'-Primer: 5'-CCTCCTCCAAGTCCCAGCGAACCC-3', 3'-Primer: 5'-TGTGATGTTCTCCATATGCAGCGC-3') wurde die präS-Region aus pNI2.L amplifiziert. Das Fragment wurde mit *XmaI* und *NdeI* verdaut und ersetzte das *XmaI-NdeI*-Fragment aus pNI2.L/*NdeI*_{HA}.

Zur Proteinexpression *in vitro* wurde der Vektor pSP64(polyA) (Promega) eingesetzt. Die Transkription steht hierbei unter Kontrolle des SP6-RNA-Polymerase-Promotors. Es wurden folgende Konstrukte verwendet:

- **pSP64.S, pSP64.L und pSP64.Lo** (Prange und Streeck, 1995)

1.3 Antikörper

- **K37:** polyklonales Kaninchenantiserum gegen HBsAg-Partikel
- **K47:** polyklonales Kaninchenantiserum gegen die präS1-Region von L
- **αHA-AK:** monoklonaler Maus-AK gegen das Hämagglutinin (HA)-Epitop, (BabCO)
- **αRab2:** polyklonales Kaninchenserum gegen den C-Terminus des humanen Rab2 (P19-Protein) des intermediären Kompartiments (IC), (sc-307, Santa Cruz Biotechnology)
- **α58K:** Monoklonaler Maus-AK gegen das 58K-Protein des Golgi-Komplexes (Clone 58K-9, Sigma)
- **αPDI:** monoklonaler Maus-AK (1D3) gegen den C-Terminus (KDDDKAVKDEL) der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) (eine freundliche Gabe von Stephen Fuller, EMBL Heidelberg). Im Western-Blot erkennt der Antikörper sowohl PDI als auch crp55 (Calreticulin)
- **αBiP:** monoklonaler Maus-AK gegen den C-Terminus (KSEKDEL) des Chaperons Grp78 (BiP) (SPA-827, StressGen)
- **αHsp70:** monoklonaler Maus-AK, der sowohl konstitutiv-exprimiertes (Hsc73) als auch induzierbares Hsp70 (Hsp72) erkennt (Clone BRM-22, Sigma)
- **αHsc70:** monoklonaler Ratten-AK, spezifisch gegen das konstitutiv-exprimierte Hsc70-Chaperon (Hsc73) (SPA-815, StressGen)

- α Hsp40: polyklonales Kaninchenserum gegen das Kochaperon Hsp40 (SPA-400, StressGen)
- α Calnexin: polyklonales Kaninchenserum gegen den C-Terminus (AEDEILNRSPNRKPRRE) von Calnexin (SPA-860, StressGen)

1.4 Lösungen

- Brefeldin A (BFA, Sigma): 10 μ g/ μ l in Ethanol, Lagerung bei -20°C
- Dithiothreitol (DTT, Roth): 1M in *Aqua bidest.*, Lagerung bei 4°C
- N-Ethylmaleinimid (NEM, Sigma): 1M in Ethanol, Lagerung bei -20°C
- Digitonin (Sigma): 40 mg/ml in DMSO, Lagerung bei -20°C

2. Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

Die grundlegenden molekularbiologischen Methoden wurden in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989) und Ausubel *et al.* (1994) durchgeführt. Dazu zählen:

- das Anlegen von Bakterienkulturen in flüssigen und auf festen Kulturmedien
- Mini-, Midi- und Maxipräparationen von Plasmid-DNA
- Reinigung und Konzentration von Plasmid-DNA aus wässrigen Lösungen
- Fragmentierung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen
- Manipulation der Enden linearer DNA-Fragmente
- Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese
- Reinigung von DNA aus Agarosegelen
- Ligation von DNA-Fragmenten
- Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen
- DNA-Sequenzierung nach Sanger *et al.* (Sanger *et al.*, 1977)
- gerichtete Mutagenese unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion
- Darstellung von Proteinen durch SDS-PAGE
- Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membran (Western-Blot)
- Proteinnachweis durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL)

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von COS7-Zellen

COS7-Zellen wurden in Zellkulturmedium (Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM; GibcoBRL) unter Zugabe von 10% (v/v) fötalem Rinderserum (FCS; GibcoBRL), 100 U/ml Penicillin G (GibcoBRL), 100 µg/ml Streptomycin (GibcoBRL) und 1 mM Natriumpyruvat (GibcoBRL) bei 37°C/5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden sie für 1 Minute mit PBS/2,5 mM EDTA inkubiert, der Überstand wurde abgenommen und die Inkubation für weitere 5 Minuten fortgesetzt. Abschließend wurden die Zellen mit Zellkulturmedium abgelöst, verdünnt und in eine Gewebekulturflasche (Greiner) überführt.

2.2.2 Transiente Expression in COS7-Zellen

COS7-Zellen wurden mittels Elektroporation transfiziert (Neumann *et al.*, 1982). Dazu wurden für einen Elektroporationsansatz 5×10^6 Zellen mit PBS/2,5 mM EDTA von der Kulturplatte gelöst (2.2.1) und in 1 ml HBS-Puffer (21 mM Hepes, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 6 mM Glukose, pH 7,05) resuspendiert. Nach Zugabe von 12 µg Plasmid-DNA erfolgte die Elektroporation in einem „Cell-Porator“ (GibcoBRL) bei 200 V, 1600 µF. Die Zellen wurden abschließend möglichst rasch in Zellkulturmedium aufgenommen und in eine Gewebekulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm (Greiner) überführt. Die transiente Proteinexpression erfolgte über 48-72 Stunden.

2.2.3 Brefeldin A-Behandlung von COS7-Zellen

Brefeldin A (BFA) wurde eingesetzt, um den Transport von Proteinen aus dem ER zu blockieren. BFA inhibiert den GTP-Austausch bei verschiedenen Mitgliedern der ARF- (ADP ribosylation factor-) Familie und hemmt die Bindung des zytosolischen Coatomer- (COPI-) Komplexes an Golgi-Membranen. Es löst letztlich eine schnelle Umverteilung des Golgi-Apparates zum ER aus und blockiert somit den sekretorischen Protein-Transport aus dem ER (Chardin und McCormick, 1999).

COS7-Zellen wurden durch Elektroporation transfiziert, in 20 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in einer Gewebekulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm kultiviert. Eine Stunde nach Transfektion wurden 2 µg/ml BFA (Sigma) dem Medium zugegeben. Neun Stunden nach Transfektion wurde dann zusätzlich 1 µg/ml BFA zugegeben und 22 bzw. 34

Stunden nach Transfektion nochmals jeweils 2 µg/ml. Die Zellen wurden abschließend nach 44 Stunden geerntet.

2.2.4 Metabolische radioaktive Proteinmarkierung

Die radioaktive Markierung von Proteinen erfolgt durch den Einbau radioaktiver Aminosäuren während ihrer Synthese. Durch Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern kann das Protein von Interesse aus dem Gemisch radioaktiv-markierter Proteine isoliert werden.

COS7-Zellen einer Gewebekulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm wurden 48 Stunden nach Transfektion zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und für 30-40 Minuten mit 6 ml methioninfreiem Minimal Essential Medium (MEM, GibcoBRL) ohne FCS bei 37°C/5% CO₂ kultiviert. Anschließend erfolgte eine Pulse-Markierung mit 300 µCi [³⁵S] Methionin/Cystein (NEG-772 easytagTM express protein labeling mix ³⁵S, Perkin Elmer) in 1 ml MEM für 10-30 Minuten. Die Zellen wurden nach der Markierung entweder sofort zweimal mit kaltem (4°C) TBS-Puffer (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,5) gewaschen und geerntet, oder zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen und für 10-45 Minuten (Chase-Phase) in 6 ml Chasemedium (Zellkulturmedium mit je 15 µg/ml Methionin und Cystein) weiterkultiviert. Die Analyse radioaktiv-markierter Proteine wurde nach SDS-PAGE mittels eines PhosphorImagers (Molecular Dynamics) durchgeführt.

2.2.5 Proteinexpression unter reduzierenden Bedingungen

Um die Bildung von Disulfidbindungen bei neu-synthetisierten Proteinen zu verhindern, wurde eine Proteinexpression unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurden die Proteine zunächst radioaktiv markiert (2.2.4, Pulse-Chase). In Abweichung dazu wurden die Zellen zunächst mit Waschpuffer (PBS mit 0,9 mM Ca²⁺ / 0,5 mM Mg²⁺) gewaschen. Zusätzlich wurde 5 Minuten vor und sowohl während der gesamten Pulse- (10 Minuten) als auch der gesamten Chase-Phase (20 Minuten) 10 mM Dithiothreitol (DTT, Roth) den jeweiligen Medien zugesetzt. Nach erfolgter Markierung wurden die Zellen zweimal mit kaltem (4°C) Stoppuffer (Waschpuffer mit 20 mM N-Ethylmaleimid (NEM, Sigma) gewaschen. Die Homogenisation der Zellen erfolgte ebenfalls unter Zugabe von 20 mM NEM, um freie Sulfhydrylgruppen zu blockieren.

2.3 Nachweis und Charakterisierung von Proteinen

2.3.1 Proteaseschutzversuche

Mit Proteaseschutzversuchen können Struktur und Orientierung transmembraner Proteine untersucht werden. Die Resistenz bzw. Sensitivität von Proteindomänen gegenüber einer proteolytischen Spaltung gibt hierbei Auskunft über die Ausrichtung bestimmter Bereiche innerhalb eines Transmembranproteins.

Es wurde zunächst eine transiente Proteinexpression über 48 Stunden in COS7-Zellen durchgeführt (2.2.2). Je nach Fragestellung wurde eine Pulse-Chase-Markierung der Proteine angeschlossen (2.2.4). Es folgte eine Präparation intakter Mikrosomen. Dazu wurden die Zellen auf Eis überführt, zweimal mit kaltem (4°C) TBS-Puffer gewaschen und für 15 Minuten in 1 ml hypotonischem Puffer (0,1 x TBS) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gerntet, 4 x durch eine feinporige Kanüle (25G) passagiert und in einem „Dounce-Homogenisator“ 20 x homogenisiert. Danach wurde das Homogenisat auf 1 x TBS eingestellt und ein postnukleärer Überstand (PNS) durch Zentrifugation bei 1000 x g für 15 Minuten, 4°C gewonnen. Der PNS wurde auf ein 10%iges (w/v) Saccharose-Kissen in TBS aufgeschichtet und in einem SW60-Rotor (Beckman) für 45 Minuten bei 200000 x g, 4°C ultrazentrifugiert. Anschließend wurde das mikrosomale Pellet in 1 ml TBS mittels 8-maliger Passage durch eine 25G-Kanüle wiederum homogenisiert. Die Mikrosomenpräparation wurde gedrittelt und entsprechend dem nachfolgendne Schema behandelt:

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Mikrosomen	330 μ l	330 μ l	330 μ l
100 mM CaCl ₂	10 μ l	10 μ l	-
Trypsin [10 mg/ml]	-	4 μ l	4 μ l
10% (v/v) NP-40	-	-	20 μ l
Inkubation für 1 Stunde auf Eis			
Aprotinin [10mg/ml]	-	20 μ l	20 μ l
Inkubation für 20 Minuten auf Eis			
10% (v/v) NP-40	20 μ l	20 μ l	-
Inkubation für 20 Minuten auf Eis			

Abschließend wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 16000 x g, 4°C zentrifugiert und der Überstand entweder einer Immunpräzipitation (2.3.4) oder einer TCA-Fällung unterzogen. Dazu wurde dem Überstand 10% (v/v) Tri-Chlor-Essigsäure (TCA) zugesetzt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden für 30 Minuten bei 16000 x g, 4°C abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit einer 5%igen TCA-Lösung und einmal mit Aceton gewaschen und schließlich in Laemmli-Auftragspuffer (50 mM Tris-Cl pH 6,8, 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau, 10% Glycerin, 5% β -Mercaptoethanol) für 5 Minuten bei 100 °C gekocht. Die Proben wurden mittels Immunoblot analysiert.

2.3.2 Enzymatische Deglykosylierung durch Peptid:N-Glykosidase F

Peptid:N-Glykosidase F (PNGaseF) ist eine Asparagin-Amidase, welche die Bindung zwischen dem Asparaginsäure-Rest des Proteins und dem N-Acetylglukosamin, das die Oligosaccharidkette mit dem Protein verbindet, spaltet.

Eine Behandlung mit PNGaseF wurde nach Mikrosomenpräparation (2.3.1) aus transfizierten COS7-Zellen durchgeführt. Dazu wurden 300 μ l der Mikrosomenpräparation in 0,5% SDS, 1% β -Mercaptoethanol für 10 Minuten bei 100 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf eine Endkonzentration von 50 mM Natriumphosphat (pH 7,5), 1% (v/v) NP-40 eingestellt und 2000 U PNGaseF (New England BioLabs) wurden zugegeben. Der Verdau erfolgte für 60 Minuten bei 37°C. Die Proteine wurden abschließend mittels TCA gefällt (2.3.1).

2.3.3 Natriumcarbonat-Extraktion

Um periphere und integrale Membranproteine zu trennen, wurde eine Natriumcarbonat-Extraktion (Fujiki *et al.*, 1982) angewendet. Hierbei werden Membranvesikel geöffnet, so daß sowohl der lösliche Inhalt der Vesikel als auch peripher-assoziierte Proteine von den Membranen durch Ultrazentrifugation getrennt werden können. Nur integrale Membranproteine verbleiben unter diesen Bedingungen in der Vesikelmembran.

Bei dieser Methode wurde das mikrosomale Pellet nach Ultrazentrifugation (2.3.1) in 1 ml 100 mM Natriumcarbonat (pH 11,5) durch 10-malige Passage durch eine feinporige Kanüle (25G) resuspendiert und für 1 Stunde auf Eis gelagert. Nach Auffüllung mit 100 mM Natriumcarbonat (pH 11,5) auf ein Endvolumen von 3,7 ml wurden die Membranen in einer zweiten Ultrazentrifugation für 30 Minuten bei 140000 x g und 4°C in einem SW60-Rotor (Beckman) nochmals pelletiert. Der Überstand wurde mit Essigsäure neutralisiert und durch TCA-Fällung konzentriert (2.3.1). Das Pellet wurde zunächst in 300 μ l TBS-Puffer

resuspendiert, anschließend wurden 20 µl 10% (v/v) NP-40 zugegeben und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Abschließend erfolgte ebenfalls eine TCA-Fällung (2.3.1).

2.3.4 Immunpräzipitation

Zum Überstand nach Proteaseschutzversuch (2.3.1) wurden 7 µl polyklonales Kaninchenantiserum, spezifisch gegen HBsAg (K37) oder gegen die präS1-Region des L-Proteins (K47), gegeben und über Nacht bei 4°C in einer Überkopfschaukel inkubiert. Zur Isolierung der Protein-Antikörper-Komplexe wurde 10% (w/v) Protein G-Agarose (Virofem Diagnostika) zugegeben und für eine weitere Stunde bei 4°C in der Überkopfschaukel inkubiert. Durch Zentrifugation bei 16000 x g und Raumtemperatur für 20 Sekunden wurde die Agarose sedimentiert und anschließend dreimal mit je 750 µl RIPA-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% (v/v) NP-40, 0,5% (v/v) Triton X-100, 0,1% (w/v) SDS) und einmal mit 750 µl 125 mM Tris-Cl pH 6,8 gewaschen. Das Agarosesediment wurde mittels einer Glasspritze (Hamilton) trockengelegt und in Laemmli-Auftragspuffer für 5 Minuten bei 100°C gekocht.

2.3.5 Zellyse unter nichtdenaturierenden Bedingungen

Der Zellrasen in einer Gewebekulturschale (10 cm Durchmesser) wurde 48 Stunden nach Transfektion (2.2.2) zweimal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen. Dann wurden 800 µl Lysepuffer (PBS pH 7,5, 0,1% (v/v) Triton X-100, Proteaseinhibitor-Mix (Complete, Roche), 5 mM Mg-ATP, 80 mM Phosphokreatin, 500 µg/ml Kreatin-Kinase (Roche)) auf die Zellen gegeben und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden von der Gewebekulturschale abgeschabt, mittels zweimaliger Passage durch die Spitze einer 1 ml-Pipette vorsichtig homogenisiert und ein post-nukleärer Überstand (PNS) wurde durch Zentrifugation bei 16000 x g und 4°C für 5 Minuten gewonnen.

2.3.6 Koimmunpräzipitation

Mittels Koimmunpräzipitation wurde die direkte Interaktion von Proteinen nachgewiesen. Dabei wurde in einem Zellysat, das unter nicht-denaturierenden Bedingungen gewonnen wurde, zunächst ein Protein durch Präzipitation mit einem spezifischen Antikörper isoliert und nachfolgend mögliche Interaktionspartner mit einem zweiten Antikörper identifiziert.

Zur Koimmunpräzipitation wurden superparamagnetische Polystyren-Kügelchen (Beads) benutzt, deren Oberfläche mit p-Toluensulphonyl-Chlorid aktiviert ist (Dynabeads M-450 tosylaktiviert, DYNAL). Proteine mit Amino- oder Sulfhydryl-Gruppen können somit kovalent an die aktivierte Oberfläche der Beads gebunden werden. In der hier beschriebenen

Methode wurden Antikörper spezifisch für zelluläre Chaperone an die Beads gekoppelt. Dazu wurden pro Ansatz 10^7 Beads mit Puffer A (20 mM NaH_2PO_4 , 80 mM Na_2HPO_4) gewaschen. Während der einzelnen Waschschriffe wurden die Beads unter Einsatz eines Magneten (Dynal MPC) jeweils gesammelt. Zu den gewaschenen Beads ($10^7/25\mu\text{l}$ Puffer A) wurden dann 5 μg Antikörper hinzugegeben, sorgfältig gemischt und für 20 Stunden bei 37°C in einer Überkopfschaukel inkubiert. Anschließend wurden die Beads zweimal für je 5 Minuten in Puffer D (PBS pH 7,4, 0,1% (w/v) BSA, 4°C), einmal für 20 Stunden in Puffer E (0,2 M Tris-Cl pH 8,5, 0,1% (w/v) BSA, 20°C) und abschließend nochmals für 5 Minuten in Puffer D gewaschen. Zu den Beads wurden dann 500 μl Zellysat (2.3.5) gegeben und der Ansatz für 2 Stunden bei 4°C in einer Überkopfschaukel inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Beads zweimal mit je 600 μl Lysepuffer (PBS pH 7,5, 0,1% (v/v) Triton X-100, Proteaseinhibitor-Mix (Complete, Roche), 5 mM Mg-ATP, 80 mM Phosphokreatin, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kreatin-Kinase (Roche)) gewaschen und in 40 μl Laemmli-Auftragspuffer für 5 Minuten bei 100°C aufgekocht. Die Analyse erfolgte mittels Immunoblot.

2.3.7 Herstellung eines Nycodenz-Gradienten zur subzellulären Fraktionierung

Durch Verdünnung einer 27,6% igen (w/v) Nycodenz- (Nycomed Diagnostica) Stammlösung (10 mM Tris-Cl pH 7,4, 3 mM KCl, 1mM EDTA) mit Verdünnungspuffer (10 mM Tris-Cl pH 7,4, 3 mM KCl, 1mM EDTA, 0,75% (w/v) NaCl) wurden vier Lösungen mit unterschiedlichen Nycodenzkonzentrationen hergestellt (24%, 19,33%, 14,66% und 10%, jeweils (w/v)). Dann wurde in einem Ultrazentrifugationsgefäß (passend für SW40-Rotor von Beckman) ein vierstufiger Gradient erzeugt. Aus diesem Stufengradienten wurde ein linearer Gradient erstellt, indem das Gefäß für 45 Minuten bei RT horizontal gelagert wurde. Um ein nichtlineares Dichteprofil zu erzeugen, wurde der Gradient abschließend für vier Stunden bei $235000 \times g$ und 15°C in einem SW40-Rotor ultrazentrifugiert.

2.3.8 Subzelluläre Fraktionierung

Um aus einem Zellysat das Endoplasmatische Reticulum, das Intermediäre Kompartiment und den Golgi-Apparat zu trennen, wurde eine Dichtezentrifugation in einem nichtlinearen Nycodenzgradienten (2.3.7) angewendet.

Dazu wurde eine Zellkulturschale (10 cm Durchmesser) mit konfluentem Zellrasen transfizierter COS-7 Zellen zunächst zweimal mit je 5 ml Homogenisationspuffer (10 mM Triethanolamin, 10 mM Essigsäure, 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Homogenisationspuffer unter Zugabe

von je 10 µg/ml Chymostatin, Leupeptin, Antipain und Pepstatin (Sigma) geerntet. Die Zellen wurden durch 12-malige Passage durch eine 25G-Kanüle homogenisiert und ein postnukleärer Überstand (PNS) durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 x g und 4°C hergestellt. Der PNS wurde auf einen vorgeformten Nycodenz-Gradienten (2.3.7) geladen und in einem SW40-Rotor (Beckman) 1,5 Stunden bei 235000 x g, 4°C ultrazentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden ausgehend vom Boden des Gradienten 15 Fraktionen á 770 µl gesammelt und mit einem Refraktometer deren Brechungsindex bestimmt. Abschließend wurden die Proben durch TCA-Fällung konzentriert (2.3.1) und mittels Immunoblot analysiert.

2.3.9 Semi-Permeabilisierung von COS7-Zellen durch Digitonin

Grundlage für die Semi-Permeabilisierung von COS7-Zellen war ein Protokoll von Wilson *et al.* (1995). Bei dieser Methode wird nur die äußere Membran der Zellen permeabilisiert, während die inneren Kompartimente intakt bleiben.

Der konfluente COS7-Zellrasen einer Gewebekulturflasche (75 cm²) wurde durch PBS/2,5 mM EDTA abgelöst (2.2.1), die Zellen wurden pelletiert und in 6 ml kaltem KHM-Puffer (110 mM Kalium-Acetat, 20 mM Hepes pH 7,2, 2 mM Magnesium-Acetat) resuspendiert. Nach Zugabe von 240 µg Digitonin wurden die Zellen für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz durch Zugabe von 8 ml KHM verdünnt und die Zellen pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in 6 ml KH-Puffer (90 mM Kalium-Acetat, 50 mM Hepes pH 7,2) resuspendiert und nochmals für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die permeabilisierten Zellen nach Sedimentierung in 100 µl KHM-Puffer aufgenommen und direkt in eine *In vitro*-Translationsreaktion eingesetzt.

2.3.10 Expression von Proteinen *in vitro*

Zur *In vitro*-Expression wurden die Gene der HBV-Hüllproteine in den Vektor pSP64(polyA) (Promega) kloniert (Prange und Streeck, 1995), so daß ihre Transkription unter der Kontrolle des SP6-RNA-Polymerase-Promotors steht. Die Translation erfolgte mittels des Kaninchen-Reticulozytenlysats (Pelham und Jackson, 1976), ein eukaryotisches System, daß potentiell dazu in der Lage ist, sowohl posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierungen, Acetylierungen und Isoprenylierungen (Pollard *et al.*, 1990) als auch nach Zugabe von mikrosomalen Membranen die Spaltung des Signalpeptids und N-Glykosylierungen (Walter und Blobel, 1983) durchzuführen.

Transkription:

Die *In vitro*-Transkription wurde mit Hilfe des RiboMAXTM-Systems (Promega) und der SP6-Polymerase durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden pSP64-Plasmide (pSP64.S, pSP64.L und pSP64.Lo) zunächst mittels *ScaI*-Restriktionsverdau linearisiert und anschließend die Transkriptionsreaktion entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

Translation:

Die *In vitro*-Translation erfolgte unter Verwendung des FlexiRabbit-Reticulozytenlysatsystems (Promega). Dieses System erlaubt die Optimierung der Translationsreaktion durch Veränderung verschiedener Parameter (Mg^{2+} -, K^{+} -, DTT-Konzentration). In einer typischen Reaktion wurde 1 μ g mRNA in Gegenwart von 10 μ Ci [³⁵S]-Methionin (1000 Ci/mmol, Amersham), 70 mM KCl und 1,8 mM Magnesium-Acetat 90 min bei 30°C translatiert. Durch Zusatz von Mikrosomen aus Hundepankreas (Promega) oder COS7-Zellen, die mit Digitonin permeabilisiert wurden (2.3.9), konnte darüberhinaus die Translokation und eine kotranslationale Modifikation der Proteine getestet werden. Zur Rückgewinnung und Reinigung mikrosomaler Partikel wurden diese zunächst durch Zugabe von 3 mM Tetracain und 1,2 mM $CaCl_2$ stabilisiert und dann wurde das Reaktionsgemisch durch 1 ml 250 mM Saccharose/TBS für 30 Minuten bei 16000 x g, 4°C sedimentiert. Anschließende Proteaseschutzversuche erfolgten nach folgendem Schema:

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Mikrosomen	8 μ l	8 μ l	8 μ l
10 mM $CaCl_2$	1,5 μ l	1,5 μ l	-
Trypsin [1 mg/ml]	-	1 μ l	1 μ l
10% (v/v) NP-40	-	-	1 μ l
Inkubation für 1 Stunde auf Eis			
Aprotinin [10 mg/ml]	-	1 μ l	1 μ l
Inkubation für 20 Minuten auf Eis			
10% (v/v) NP-40	1 μ l	1 μ l	-
Inkubation für 20 Minuten auf Eis			

Transkription/Translation:

Es wurde ebenso das TNT-SP6-gekoppelte Transkriptions/Translations-System (Promega) verwendet, das eine *In vitro*-Proteinexpression „in einem Schritt“ ermöglicht. Die Durchführung erfolgte dabei nach Herstellerangaben.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 HBsAg-ELISA

Zum Nachweis von HBsAg wurde der „Auszyme Monoklonal Diagnostic Kit“ (Abbott) verwendet. Bei diesem ELISA wurde eine Kugel, die mit monoklonalen anti-HBsAg-Antikörpern der Maus beschichtet ist, mit der zu untersuchenden Probe inkubiert. Dem Ansatz wurde zusätzlich ein monoklonaler anti-HBsAg-Antikörper in löslicher Form zugegeben, der mit Meerrettich-Peroxidase (HRPO = horseradish-peroxidase) gekoppelt ist. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Konzentration an HBsAg mit Hilfe der HRPO-katalysierten Farbreaktion von OPD (Ortho-Phenyldiamindihydrochlorid)/H₂O₂ als Substrat photometrisch bei einer Wellenlänge von 492 nm bestimmt.

2.4.2 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

COS7-Zellen wurden durch Elektroporation (2.2.2) transient transfiziert, auf Deckgläschen in 6-Loch-Platten ausgesät und in Zellkulturmedium bei 37°C für bis zu 48 Stunden kultiviert (2.2.1). Anschließend wurde das Medium durch zweimaliges Waschen mit PBS-Puffer entfernt und die Zellen mit 1 ml Methanol/2 mM EGTA bei -20°C für 15 Minuten fixiert. Das Methanol wurde durch gründliches Waschen mit PBS entfernt und unspezifische Bindungsstellen entweder mit 5% Magermilchpulver in PBS oder 3% Ziegen-Normalserum in PBS (v/v) blockiert. Der primäre Antikörper wurde spezifisch mit PBS verdünnt und 50 µl dieser Lösung wurden direkt auf das Deckglas getropft. Es folgte eine Inkubation für 60 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer. Anschließend wurde nichtgebundener Antikörper durch mehrmaliges Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Bei Koimmunfluoreszenzen wurde nachfolgend der zweite primäre Antikörper nach dem gleichen Verfahren gebunden. Die sekundären Antikörper wurden nach Herstellerangaben in PBS verdünnt und ebenfalls entweder einzeln oder gemeinsam (Koimmunfluoreszenz) direkt auf das Deckglas getropft. Bei Koimmunfluoreszenzen wurde der sekundäre α-Maus-IgG-AK aus Ziege, gekoppelt mit Dichlorotriazinylamino-Fluorescein (DTAF), in einer Verdünnung von 1:200 und der sekundäre α-Kaninchen-IgG-AK aus Ziege, gekoppelt mit Rhodamin RedX (RRX), in einer

Verdünnung von 1:800 in PBS verwendet. Die Inkubation der sekundären Antikörper erfolgte ebenfalls für 60 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer. Danach wurde nochmals überschüssiger Antikörper durch gründliches Waschen mit PBS entfernt. Abschließend wurde das Deckglas in Wasser getaucht, um Salzkristallbildung beim Trocknen zu verhindern und die getrockneten Proben mit Histogel (Sigma) eingedeckt.

III. Ergebnisse

1. Untersuchungen zum Mechanismus der posttranslationalen präS-Translokation des HBV L-Hüllproteins

1.1 Die Bedeutung struktureller Determinanten des L-Moleküls für die posttranslationale präS-Translokation

Ein wichtiger Ansatzpunkt der vorliegenden Untersuchungen war die Hypothese eines HBV-spezifischen Transmembrankanals, für den angenommen wurde, daß er durch Dimerisierung des S-Hüllproteins entsteht und eine präS-Translokation ermöglicht. Die strukturellen Komponenten des Kanals sollten dieser Hypothese zur Folge wesentlich die Transmembrandomänen TM1, TM3 und TM4 innerhalb der S-Region sein. Mit Hilfe einer Mutagenese sollte nun zunächst dieses Modell überprüft und damit die Bedeutung einzelner Strukturelemente des L-Moleküls bezüglich der präS-Translokation aufgeklärt werden.

1.1.1 Einführung in das experimentelle System anhand des L-Wildtyp-Proteins

Der Proteaseschutzversuch ist ein wichtiger experimenteller Ansatz zur Untersuchung der Topologie eines Membranproteins. Sein Prinzip beruht auf der Sensitivität oder Resistenz von Proteinregionen gegenüber zugesetzten Proteasen aufgrund ihrer Ausrichtung in Membranen. Zur Untersuchung des L-Proteins wurden Mikrosomen durch Fraktionierung aus transient-transfizierten Säugerzellen gewonnen und anschließend mit der Protease Trypsin behandelt. Die Trypsinbehandlung wurde dabei unter zwei verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Zum einen erfolgte die Proteolyse mit intakten mikrosomalen Membranen, zum anderen nach Auflösung der Membranen durch ein nichtdenaturierendes Detergenz. Im ersten Fall sollten folglich Proteinbereiche, die luminal orientiert sind, vor proteolytischer Spaltung geschützt sein, während der zweite Ansatz als Kontrolle für die Spaltbarkeit des Proteins diene, da auch die Tertiärstruktur von Proteinen potentielle Spaltstellen unzugänglich machen kann. Als Referenz wurden in einem dritten Ansatz Mikrosomen mitgeführt, die weder mit Trypsin noch mit Detergenz behandelt wurden.

Zunächst mußte jedoch sichergestellt sein, daß die verwendete Mikrosomenfraktion kein Eindringen der Protease in das Lumen erlaubte. Um die Integrität der präparierten Mikrosomen zu überprüfen, wurde zunächst das Verhalten der zellulären Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) im Proteaseschutzversuch analysiert. PDI ist ein lösliches Protein im Lumen des ER, so daß es bei intakten mikrosomalen Membranen vollständig vor Proteolyse geschützt sein sollte. Mikrosomen aus COS7-Zellen wurden daher mit Trypsin behandelt, die Proteine anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Western-Transfer mit einem PDI-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Dieser Antikörper weist neben der Spezifität für PDI (55 kDa) eine Kreuzreaktivität gegenüber Calreticulin (48 kDa) auf, ein ebenfalls lösliches Chaperon im Lumen des ER von Säugerzellen (Abb. 8, Spur 1). Es zeigte sich, daß beide Proteine durch Trypsin nicht gespalten wurden (Abb. 8, Spur 2). Wurde die mikrosomale Membran hingegen durch das nichtdenaturierende Detergenz NP-40 zerstört, war eine Spaltung möglich (Abb. 8, Spur 3). Dies bestätigte - anlehnend an das Versuchsprotokoll -, daß die präparierten Mikrosomen keine Schäden aufwiesen, die ein Eindringen der Protease in das mikrosomale Lumen erlauben würden.

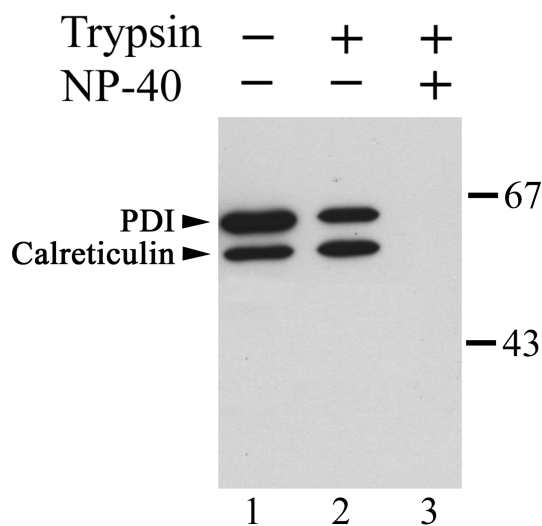


Abb. 8: Trypsinschutzversuch zur Kontrolle der Integrität verwendeter Mikrosomen.

Mikrosomen aus COS7-Zellen wurden nicht behandelt (-/-) oder mit Trypsin in Abwesenheit (+/-) oder Anwesenheit (+/+) von NP-40 inkubiert. Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper, der sowohl Protein-Disulfid-Isomerase (PDI, 55kDa) als auch Calreticulin (48 kDa) erkennt, die durch Pfeile markiert sind. Molekulargewichte (kDa) mitgeführter Markerproteine sind rechts gekennzeichnet.

Mehrere Arbeitsgruppen haben in Untersuchungen zur Topologie des L-Proteins gezeigt, daß sich zum Zeitpunkt der Synthese und der Integration des L-Proteins in die ER-Membran die präS-Region im Zytosol befindet. Erst im Laufe der Zeit transloziert etwa die Hälfte der L-Moleküle die präS-Domäne posttranslational durch die Membran in das mikrosomale Lumen (Bruss *et al.*, 1994; Ostapchuk *et al.*, 1994; Prange und Streeck, 1995). Der Proteaseschutzversuch stellt die Methode der Wahl dar, um diesen Reifungsprozeß zu untersuchen. Während die präS-Region von neusynthetisiertem L-Protein aufgrund ihrer zytosolischen Lokalisation vollständig durch Trypsin gespalten wird, erhält ein bestimmter Anteil der L-Moleküle während der Reifung durch posttranslationale Translokation der präS-Region Resistenz gegenüber der Spaltung mit Trypsin (Abb. 9E). Da die Translokation der präS-Region bei diesen Molekülen posttranslational erfolgt, können potentielle N-Glykosylierungsstellen innerhalb der präS-Region nicht modifiziert werden, da eine N-Glykosylierung von Proteinen - soweit bekannt - ausschließlich kotranslational erfolgt (Rothman und Lodish, 1977; Glabe *et al.*, 1980; Nilsson und von Heijne, 1993). Um die prinzipielle Modifizierbarkeit dieser N-Glykosylierungsstellen zu überprüfen, kann eine kotranslationale präS-Translokation entweder durch Ligation einer N-terminalen Signal-Sequenz (Bruss und Vieluf, 1995) oder durch Deletion der postulierten zytosolischen Verankerungsdomäne (CAD) (Löffler-Mary *et al.*, 1997) herbeigeführt werden. Die Deletion der Aminosäuren 69-106 („Sau-Deletion“, ΔSau) innerhalb der präS1-Domäne beinhaltet diese CAD-Sequenz und führt somit zu einer kotranslationalen präS-Translokation und N-Glykosylierung von präS.

In den nachfolgenden Versuchen dieser Arbeit wurde das L-Protein wesentlich durch Western-Blot-Analyse dargestellt. Da für L bis heute keine Antikörper vorhanden sind, die ein lineares Epitop des Moleküls effizient erkennen, wurde L (und alle Mutanten) am C-Terminus mit einem Hämagglutinin- (HA-) Epitop markiert. Es wurde dann zunächst das Epitop-markierte L-Wildtypprotein im Proteaseschutzversuch analysiert, um topologische Veränderungen, die möglicherweise durch die HA-Markierung hervorgerufen wurden, ausschließen zu können. Das Protein wurde in transient-transfizierten COS7-Zellen exprimiert und seine Topologie mittels Trypsinschutzexperimenten untersucht. L wurde sowohl als 39 kDa- als auch als 42 kDa-Protein detektiert (Abb. 9A, Spur 1). Die enzymatische Deglykosylierung durch Peptid:N-Glykosidase F (PNGaseF) zeigte, daß die 42 kDa-Form eine N-glykosylierte Form (gp42) darstellt, während die 39 kDa-Form nichtglykosyliert ist (p39) (Abb. 9B, vgl. Spur 1 mit Spur 2). Zusätzlich traten durch interne Initiation die nichtglykosylierte und N-glykosylierte Form des S-Proteins (p24 und gp27), sowie die

einfach- bzw. zweifachglykosylierte Form des M-Proteins (gp33 und ggp36) auf. Die Behandlung mit Trypsin zeigte in Übereinstimmung mit den Arbeiten über das unmarkierte L-Wildtypprotein (Bruss *et al.*, 1994; Ostapchuk *et al.*, 1994; Prange und Streeck, 1995), daß im Gleichgewichtszustand ein Teil der L-Moleküle trypsinresistent war, während ein anderer Teil gespalten wurde (Abb. 9A, Spur 2). Durch die Spaltung an Arg¹⁵⁶ entstanden ein nichtglykosyliertes (T) und ein glykosyliertes (gT) C-terminales Fragment, die jeweils geringfügig größer waren als die entsprechende Form des S-Proteins (Abb. 9A, Spuren 2; Abb. 9E; s. auch Abb. 5). Da sich das HA-Epitop am C-Terminus von L befindet (Abb. 9D) und in seiner S-Region keine weitere Trypsin-Spaltung stattfindet, wurden diese Fragmente mit dem HA-spezifischen monoklonalen Antikörper detektiert. Nach Behandlung mit Detergenz (NP-40) erfolgte die völlige Proteolyse von L in die beiden Spaltprodukte (Abb. 9A, Spur 3).

Durch Aufnahme von Mikrosomen der transfizierten Zellen in alkalischem Puffer ist es möglich, integrale und periphere Membranproteine voneinander zu trennen. Während integrale Membranproteine in der Membranfraktion (P) verbleiben, gehen peripher-assoziierte Proteine in die lösliche Fraktion (Ü) über. Die alkalische Extraktion des L_{HA}-Proteins bestätigte, daß dieses Protein im Gleichgewichtszustand vollständig in der Membran verankert ist (Abb. 9C, Spur 1).

Insgesamt zeigten die obigen Ergebnisse, daß die Markierung des L-Proteins am C-Terminus mit einem HA-Epitop offensichtlich keinen Einfluß auf dessen Topologie und die posttranslationale präS-Translokation besitzt.

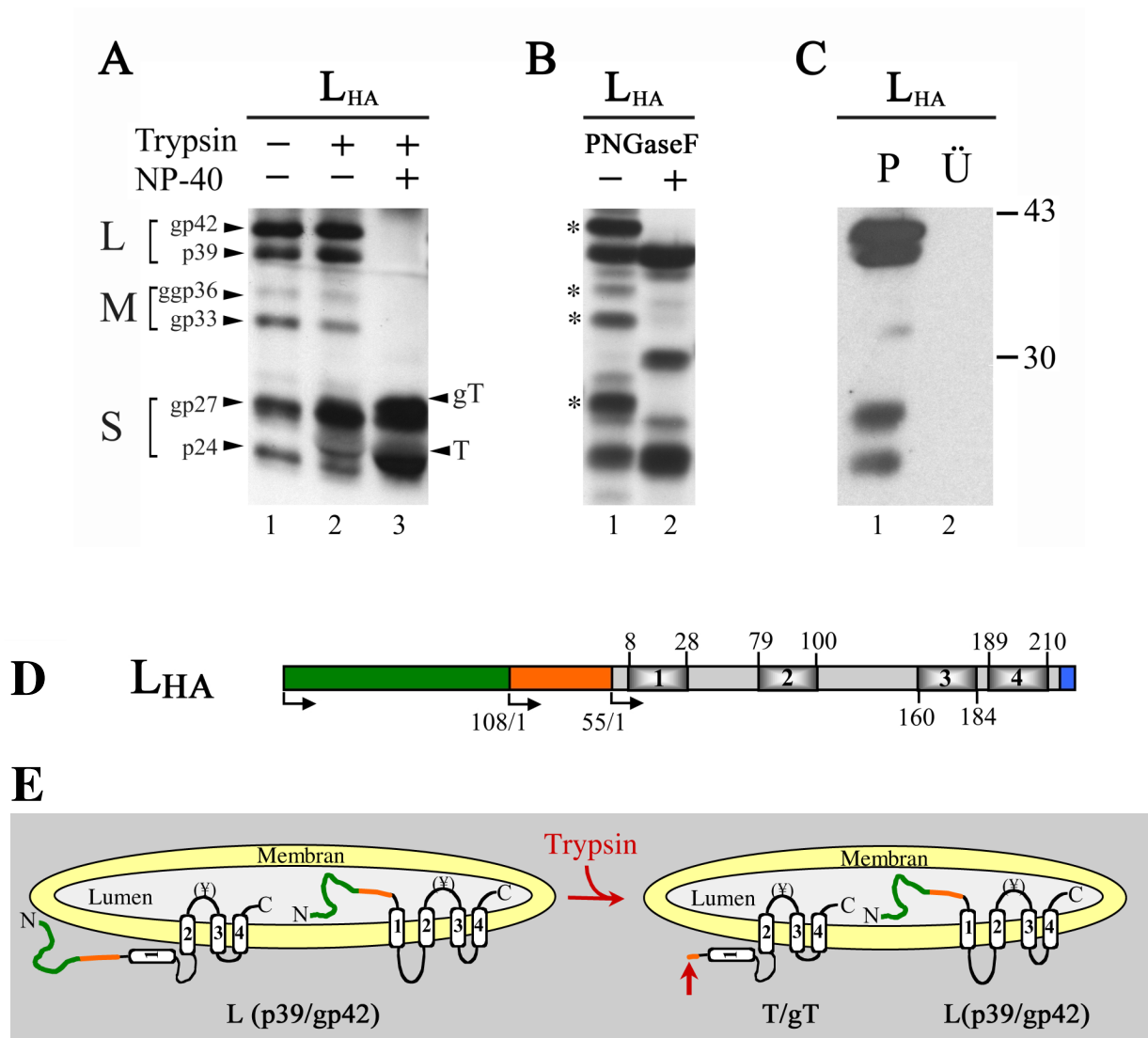


Abb. 9: Überprüfung der Topologie des Epitop-markierten L-Proteins: L_{HA} verhält sich wie L_{wt} .

(A) Trypsinschutzversuch des L_{HA} -Proteins. Mikrosomen transfizierter COS7-Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion entweder nicht behandelt (-/-) oder mit Trypsin in Abwesenheit (+/-) oder Anwesenheit (+/+) von NP-40 inkubiert. In einer Western-Blot-Analyse wurden die Proteine mit einem HA-spezifischen Antikörper detektiert. Nichtglykosylierte (p) und N-glykosylierte (gp, ggp) Formen der Proteine sind links gekennzeichnet. Rechts sind die nichtglykosylierten (T) und N-glykosylierten (gT) tryptischen Spaltprodukte mit Pfeilen markiert. (B) N-Glykosylierungsmuster des L_{HA} -Proteins. Mikrosomen transfizierter COS7-Zellen wurden entweder direkt (-) oder nach Deglykosylierung mit PNGaseF im Western-Blot analysiert. N-glykosylierte Formen sind markiert (*). (C) Natriumcarbonat-Extraktion von L_{HA} . Mikrosomen transfizierter COS7-Zellen wurden mit alkalischer Carbonat-Lösung behandelt. Durch Ultrazentrifugation wurden integrale Proteine (P) von membranassoziierten und löslichen Proteinen (S) getrennt. Die Fraktionen wurden mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Molekulargewichte (kDa) mitgeführter Markerproteine sind rechts gekennzeichnet. (D) Schematische Darstellung der Domänenstruktur des L_{HA} -Proteins. Die präS1-Region ist in grün, die präS2-Region in orange, die S-Domäne in grau und das HA-Epitop in blau dargestellt. Rechtecke innerhalb der S-Region stellen angenommene Transmembrandomänen dar. Die Zahlen ober- und unterhalb des Schemas markieren Aminosäurepositionen. Pfeile zeigen Translationsstartstellen an. (E) Schematische Darstellung eines Trypsinschutzversuchs mit dem L-Protein. Die präS-Region (grün/orange) von L (p39 bzw. gp 42) befindet sich sowohl innerhalb als auch außerhalb der Mikrosomen (links). Nach Zugabe von Trypsin ist nur die luminal orientierte präS-Region geschützt. PräS-Domänen von L, die außerhalb (zytosolisch) lokalisiert sind, werden am C-Terminus der präS2-Region proteolytisch gespalten (Pfeil) und es verbleiben die Spaltprodukte T bzw. gT (rechts). (¥) markiert die partielle Glykosylierung.

1.1.2 Die HBV S- und M-Hüllproteine sind für die präS-Translokation des L-Proteins entbehrlich

Wie einleitend beschrieben, führt die Synthese des L-Proteins aufgrund der genetischen Organisation des Leserasters der HBV-Hüllproteine gleichzeitig zur Bildung von M- und S-Proteinen. Struktur- und Funktionsuntersuchungen haben gezeigt, daß die drei HBV-Hüllproteine sowohl Homo- als auch Heterodimere, sowie größere Oligomere ausbilden können (Huovila *et al.*, 1992; Wunderlich und Bruss, 1996; Mangold *et al.*, 1997). Einhergehend mit Strukturanalysen des S-Proteins (Stirk *et al.*, 1992; Berting *et al.*, 1995) haben diese Beobachtungen zu der Hypothese geführt, daß die posttranslationale Translokation der präS-Region des L-Proteins durch einen Membrankanal erfolgen könnte, der durch Oligomerisierung der amphipathischen Transmembrandomänen des S- und/oder M-Proteins ausgebildet werden könnte. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde eine L-Mutante erstellt, bei der die Initiationsstellen des M- und S-Proteins durch Mutagenese inaktiviert wurden ($L_o = L$ “only“). Die Topologie dieser L_o -Mutante wurde im Proteaseschutzversuch analysiert, der zeigte, daß weiterhin sowohl die nichtglykosylierte (p39) als auch die einfachglykosylierte (gp42) Form des L-Proteins gebildet wurden (Abb. 10, Spur 4). Im Vergleich zum L-Wildtypprotein (Abb. 10, Spur 1) war jedoch - wie erwartet - die Synthese des M- und S-Proteins blockiert (Abb. 10, Spur 4). Entscheidend war der Befund, daß die L_o -Mutante im Vergleich zum L-Wildtypprotein die gleiche Trypsinresistenz aufwies, da etwa 60-70% der L_o -Moleküle bei intakter Mikrosomenmembran durch Trypsin nicht gespalten wurden (Abb. 10, Spur 5), während das gleichzeitige Auftreten der Spaltprodukte T und gT die Spaltung der verbleibenden L-Moleküle anzeigte (Abb. 10, Spur 5). Erst nach Auflösung der Membran durch NP-40 erfolgte die vollständige Proteolyse von L und L_o (Abb. 10, Spuren 3 und 6).

Dieser Befund zeigt deutlich, daß weder das M- noch das S-Hüllprotein für den Prozeß der posttranslationalen präS-Translokation von L erforderlich sind.

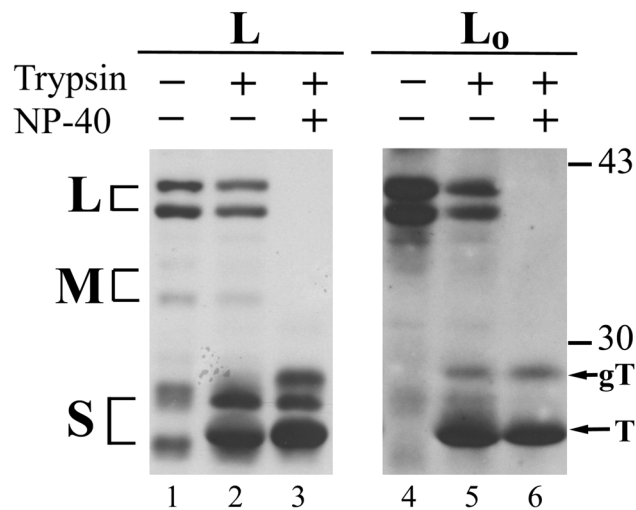


Abb. 10: Die posttranslationale präS-Translokation von L benötigt weder M- noch S-Proteine.

COS7-Zellen wurden mit dem L-Gen (links) oder mit der Mutante L_o (rechts), deren Startkodons für das M- und S-Protein mutiert sind, transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden Mikrosomen präpariert, die entweder nicht behandelt (-/-) oder mit Trypsin in Abwesenheit (+/-), oder Anwesenheit (+/+) von NP-40 inkubiert wurden. Nach SDS-PAGE und Western-Transfer wurden die Proteine mit einem HA-spezifischen Antikörper analysiert. Die Hüllproteine sind auf der linken Seite markiert. Auf der rechten Seite sind nicht-glykosylierte (T) und glykosylierte (gT) tryptische Spaltfragmente angezeigt. Molekulargewichte (kDa) mitgeführter Markerproteine sind ebenfalls rechts gekennzeichnet.

1.1.3 Disulfidbrücken-vermittelte Di- und Oligomerisierungen von L-Molekülen sind für die präS-Translokation entbehrlich

Die unerwartete Beobachtung, daß M- und S-Proteine für die posttranslationale Translokation der präS-Region entbehrlich sind, ließ jedoch die Frage offen, ob das L-Protein möglicherweise selbst durch Di- und/oder Oligomerisierung einen Membrankanal ausbilden kann. Verschiedene Arbeiten haben diesbezüglich gezeigt, daß bei der Dimerisierung der Hüllproteine mehrfach intermolekulare Disulfidbindungen ausgebildet werden (Huovila, *et al.*, 1992; Wunderlich und Bruss, 1996). Daher wurde untersucht, ob eine Blockierung der Disulfidbrückenbildung während und nach der Synthese von L seine präS-Translokation beeinflusst. Dazu wurden COS7-Zellen mit dem L_o-Protein transfiziert und vor, während und nach einer metabolischen Pulse-Chase-Markierung mit dem reduzierenden Agens Dithiothreitol (DTT) behandelt. Es folgten Proteaseschutzversuche mit anschließender Immunpräzipitation, die Auftrennung der Präzipitate in Polyacrylamidgelen und deren Darstellung durch PhosphorImaging.

Als Kontrolle für die DTT-Wirkung unter den verwendeten Versuchsbedingungen, wurde jedoch zunächst die Dimerisierung des S-Proteins in einem nichtreduzierenden Polyacrylamidgel untersucht. Es bestätigte sich, daß das S-Protein ohne Zugabe von DTT vor allem Dimere ausbildet (Abb. 11A, Spur 2). Die Expression von S unter dem Einfluß von DTT verhinderte die Dimerisierung jedoch vollständig, und es traten ausschließlich S-Monomere auf (Abb. 11A, Spur 3).

Für das L-Protein zeigte sich deutlich, daß es unter reduzierenden Bedingungen vor Trypsinspaltung ähnlich geschützt war wie unter nichtreduzierenden Kontrollbedingungen (Abb. 11B, vgl. Spur 2 mit Spur 5). Erst nach Auflösung der schützenden Mikrosomenmembran durch NP-40 wurde das L-Protein unter beiden Reaktionsbedingungen gespalten (Abb. 11B, Spuren 3 und 6). Die Translokation der präS-Region ist folglich nicht von der Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken abhängig.

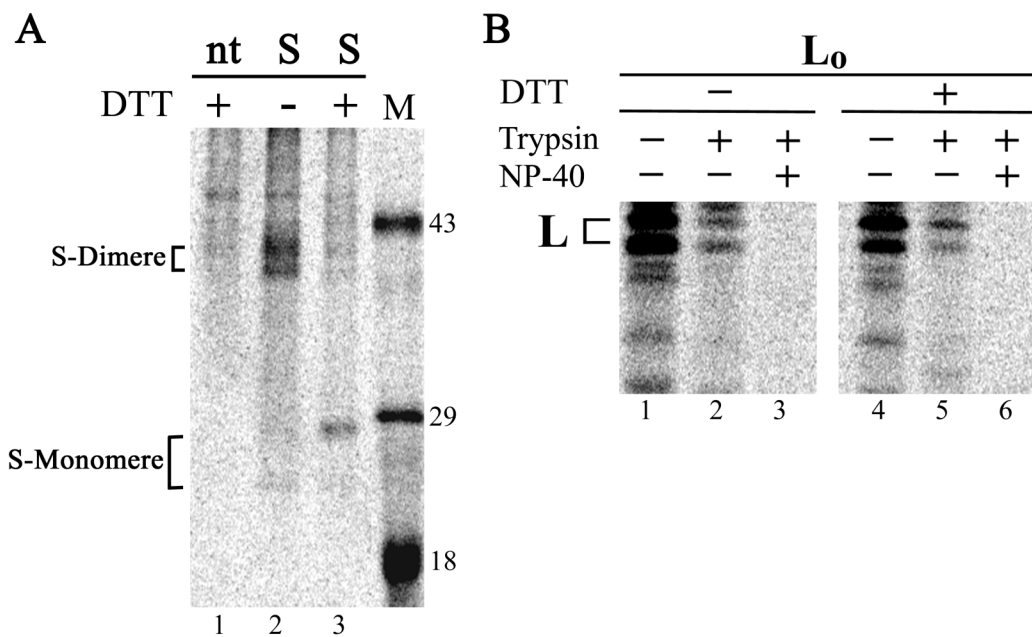


Abb. 11: Die posttranslationale präS-Translokation ist nicht von einer kovalenten Di-/Oligomer-Bildung von L-Monomeren abhängig.

COS7-Zellen wurden mit dem S- oder dem L₀-Gen transfiziert und nach zwei Tagen für 20 min metabolisch markiert. Danach wurden sie einer Chase-Phase von ebenfalls 20 min unterzogen. Die Zellen wurden während der Pulse-Chase-Markierung mit 10 mM DTT behandelt (+) oder blieben unbehandelt (-). **(A)** Nach Alkylierung wurden Zellysate aus S-transfizierten (S) und untransfizierten (nt) COS7-Zellen in einem nichtreduzierenden SDS-Gel analysiert. Unterschiedliche N-Glykosylierungsformen von S-Monomeren und -Dimeren sind auf der linken Seite markiert. Molekulargewichte (kDa) mitgeführter Markerproteine sind rechts gekennzeichnet. **(B)** Nach Alkylierung und Mikrosomenpräparation wurde ein Trypsinschutzversuch durchgeführt (s. Legende von Abb. 8 und 9). Die Proteine wurden anschließend in einem reduzierenden SDS-Gel aufgetrennt und mit einem PhosphorImager analysiert. Die Position des L-Proteins (p39/gp42) ist markiert.

1.1.4 Die amphipathischen Transmembrandomänen TM1, TM3 und TM4 des L-Proteins werden für die präS-Translokation nicht benötigt

Obwohl die oben beschriebenen Daten bereits an einem HBV-spezifischen Transmembrankanal zweifeln ließen, schien es dennoch denkbar, daß sich die amphipathischen Transmembrandomänen TM1, TM3 und TM4 innerhalb der S-Region des L-Proteins durch nichtkovalente Wechselwirkungen aneinanderlagern können, um eine Membranpore zur präS-Translokation auszubilden. Um dieser Frage nachzugehen, wurden L-Mutanten untersucht, die Deletionen amphipathischer Transmembrandomänen aufweisen. Die Topologie der Mutanten wurde wiederum mittels Proteaseschutzversuchen getestet. Es zeigte sich zunächst, daß die Deletion der Transmembrandomäne 1 (TM1) keinen Einfluß auf die kotranslationale Membranintegration des Proteins hat. Die Mutante $L\Delta TM1$ trat innerhalb der Mikrosomenfraktion ähnlich wie L in nichtglykosylierter (37 kDa) und einfachglykosylierter Form (40 kDa) auf (Abb. 12A, Spur 1). Die Behandlung mit Trypsin bei intakter mikrosomaler Membran zeigte, daß ein wesentlicher Anteil des Proteins durch luminale Ausrichtung der präS-Domäne vor Proteolyse geschützt war, während gleichzeitig auch Spaltprodukte (25 kDa) detektiert wurden (Abb. 12A, Spur 2). Diese Befunde wiesen auf eine duale Topologie und somit auf eine posttranslationale präS-Translokation der Mutante $L\Delta TM1$ hin. Der posttranslationale Modus der Translokation von präS wurde durch die fehlende N-Glykosylierung der präS-Region von $L\Delta TM1$ unterstützt.

Ebenso wurden die zwei C-terminalen Transmembrandomänen TM3 und TM4 gleichzeitig deletiert. Dabei entfiel auch die N-Glykosylierungsstelle Asn^{309} innerhalb der zweiten hydrophilen Schleife der S-Region, so daß das Produkt dieser Mutante $L\Delta TM3/4$ als nichtglykosyliertes 32 kDa-Protein detektiert wurde (Abb. 12B, Spur 1). Durch interne Initiation der Translation traten zusätzlich zwei verkürzte M-Formen (21 und 24 kDa) und eine verkürzte S-Form (17 kDa) auf. Die Mutante $L\Delta TM3/4$ war deutlich gegen Proteolyse geschützt (Abb. 12B, Spur 2). Der Schutz war auch in diesem Fall nur partiell, da bei intakter Mikrosomenmembran C-terminale Spaltprodukte auftraten (18 kDa), die geringfügig größer waren als die entsprechend deletierte, intern-gebildete S-Form. Nach Inaktivierung der M- und S-Expression ($L_o\Delta TM3/4$) wurde erwartungsgemäß ebenfalls eine duale Topologie der L-Mutante beobachtet (Abb. 12B, Spuren 4-6). Zusätzlich bestätigte die Behandlung mit PNGaseF, daß es sich bei der 32 kDa-Form der $L\Delta TM3/4$ -Mutante um ein nichtglykosyliertes Molekül handelte (Abb. 12C). Zusammenfassend wiesen diese Ergebnisse darauf hin, daß die präS-Region der $L\Delta TM3/4$ -Mutante partiell durch die Membran transloziert wurde, und diese

Translokation posttranslational erfolgte, da beide potentiellen Glykosylierungsstellen innerhalb der präS-Domäne nicht modifiziert wurden.

Um auch bei dieser Mutante die fehlende N-Glykosylierung auf Posttranslokation zurückführen zu können, mußte geklärt werden, ob ihre präS-Domäne prinzipiell durch Glykosylierung modifizierbar ist. Dazu wurde eine L Δ TM3/4-Mutante getestet, die eine zusätzliche Deletion der Aminosäuren 69-106 aufweist (Δ Sau, s.o.). Wie oben beschrieben, führt die Mutation dieses Bereiches im L-Wildtypprotein zur Kotranslokation seiner präS-Domäne und folglich zur N-Glykosylierung innerhalb der präS1- und präS2-Domäne (Löffler-Mary *et al.*, 1997). Nach Expression dieser Mutante L $_o$ Δ TM3/4 Δ Sau traten zwei Produkte auf, eine 28 kDa-Form und eine 35 kDa-Form (Abb. 12D, Spur 1). Beide waren vor Proteolyse geschützt, was eine einheitliche luminaire Orientierung der präS-Domäne andeutete (Abb. 12D, Spur 2). Der PNGaseF-Verdau zeigte, daß die 35 kDa-Form N-glykosyliert war, die 28 kDa-Form hingegen nicht (Abb. 12D, Spur 5). Aufgrund des Größenunterschieds von etwa 7 kDa konnte angenommen werden, daß es sich bei der 35 kDa-Form um eine zweifachglykosylierte Variante der Mutante handelte. Beide potentiellen Glykosylierungsstellen - Asn⁴ in präS1 und Asn¹¹² in präS2 - wurden folglich modifiziert. Dies zeigte deutlich, daß die präS-Domäne der Mutante L Δ TM3/4 durch Glykosylierung modifizierbar ist, sofern eine kotranslationale Translokation artifiziell durch die sog. Δ Sau-Deletion induziert wurde. Die fehlende Glykosylierung von L Δ TM3/4 bei gleichzeitigem partiellen Proteolyseschutz war demnach auf posttranslationale Translokation der präS-Region in das mikrosomale Lumen zurückzuführen.

Insgesamt zeigten diese Daten, daß keine der amphipathischen Transmembranregionen TM1, TM3 und TM4 für die posttranslationale Translokation der präS-Region benötigt wird. Die Ergebnisse sprechen folglich insgesamt gegen das vorgeschlagene Modell einer HBV-spezifischen Membranpore.

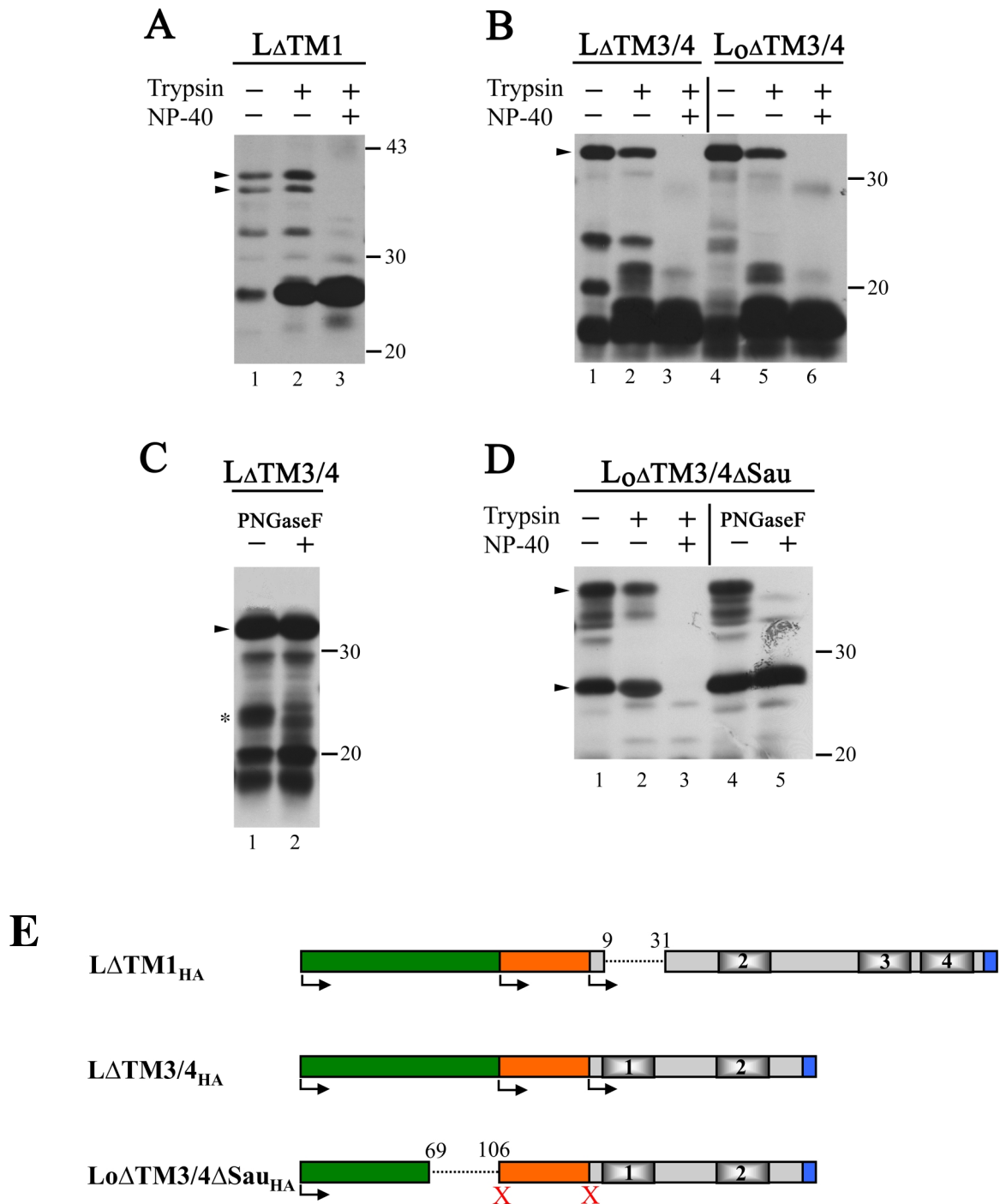


Abb. 12: Die Bedeutung einzelner TM für die posttranslationale präS-Translokation: TM1, TM3 und TM4 werden nicht benötigt.

(A-D) COS7-Zellen wurden mit den angezeigten L-Mutanten transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden Mikrosomen präpariert, mit denen Trypsinschutzversuche durchgeführt wurden (A und B) (s. Legende von Abb. 8, 9 und 10). Die Pfeile markieren die L-Proteine. (C) Alternativ wurden die Mikrosomen der transfizierten Zellen mit PNGaseF behandelt (s. Legende von Abb. 9). Der Pfeil markiert die nichtglykosylierte L-Mutante, während die glykosylierte M-Form durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet ist. (D) Trypsinschutzversuch und PNGaseF-Behandlung der Mutante $L_{\Delta TM3/4\Delta Sau}$. Die Pfeile kennzeichnen das N-glykosylierte bzw. nichtglykosylierte Protein. Molekulargewichte (kDa) mitgeführter Markerproteine sind jeweils rechts gekennzeichnet. (E) Schematische Darstellung der Domänenstruktur der L-Mutanten (s. Legende von Abb. 9). Ein rotes X markiert eine mutierte Translationsstartstelle.

1.1.5 Die hydrophobe Transmembrandomäne TM2 des L-Proteins ist für die präS-Translokation notwendig

Die oben beschriebenen Ergebnisse legten nahe, anschließend die Rolle der sehr hydrophoben Transmembrandomäne 2 (TM2) zu untersuchen. Es wurde folglich eine L-Mutante getestet, die eine Deletion von TM2 aufweist. Nach Expression dieser Mutante in COS7-Zellen konnte jedoch in der mikrosomalen Fraktion kein Produkt nachgewiesen werden (Abb. 13A, Spur 2). Erst die Analyse des rohen Zellysates zeigte, daß das Protein mit einer Größe von ca. 38 kDa zwar gebildet wurde (Abb. 13A, Spur 1), aber offensichtlich nicht in die ER-Membran eingelagert werden konnte. Diese Beobachtung deutete zwar auf eine wesentliche Rolle von TM2 bei der kotranslationalen Membranintegration von L hin, ermöglichte jedoch keine Aussage bezüglich ihrer Rolle bei der Translokation von präS. Um dennoch einen Hinweis erlangen zu können, wurde die L-Mutante $L\Delta TM2/3/4$ hergestellt, in der neben TM2 gleichzeitig auch TM3 und TM4 deletiert sind. Diese Mutante konnte in der mikrosomalen Fraktion detektiert werden und trat als 29 kDa-Protein auf (Abb. 13B, Spuren 1 und 4). Um den effizienten Einbau des Proteins in die Membran zu bestätigen, wurde eine alkalische Extraktion der Mikrosomen mit Natriumcarbonat-Puffer durchgeführt. Wie Abbildung 13C zeigt, wurde die L-Mutante vollständig innerhalb der Membranfraktion (P) detektiert (Abb. 13C, Spur 3) und war folglich in die Membran integriert. Die Einlagerung in die Membran erfolgte offensichtlich mittels seiner TM1. Eine enzymatische Deglykosylierung mit PNGaseF zeigte, daß es sich bei der L-Mutante um ein nichtglykosyliertes Produkt handelte (Abb. 13C, Spuren 1 und 2), während das gleichzeitig durch interne Initiation gebildete M-Produkt (16 kDa) (Abb. 13B, Spur 1 und Abb. 13C, Spur 1) eine N-glykosylierte Form darstellte. Interessanterweise wurde nach Behandlung der intakten Mikrosomen mit Trypsin die präS-Domäne der $L\Delta TM2/3/4$ -Mutante vollständig abgespalten und es trat ein Spaltprodukt mit einer Größe von etwa 11 kDa auf (Abb. 13B, Spuren 2 und 5), während unter den selben Versuchsbedingungen das 16 kDa-M-Produkt hingegen resistent war (Abb. 13B, Spur 2). Erst nach Auflösung der Membran durch Detergenz wurde auch die M-Form zu dem 11 kDa-Spaltprodukt abgebaut. Trypsinschutz und N-Glykosylierung der M-Form wiesen deutlich auf eine kotranslationale Translokation der präS₂-Domäne hin, während jedoch die L-Mutante aufgrund ihrer vollständigen Sensitivität gegenüber Trypsin offensichtlich nicht länger in der Lage war, eine posttranslationale Translokation der präS-Domäne durchzuführen.

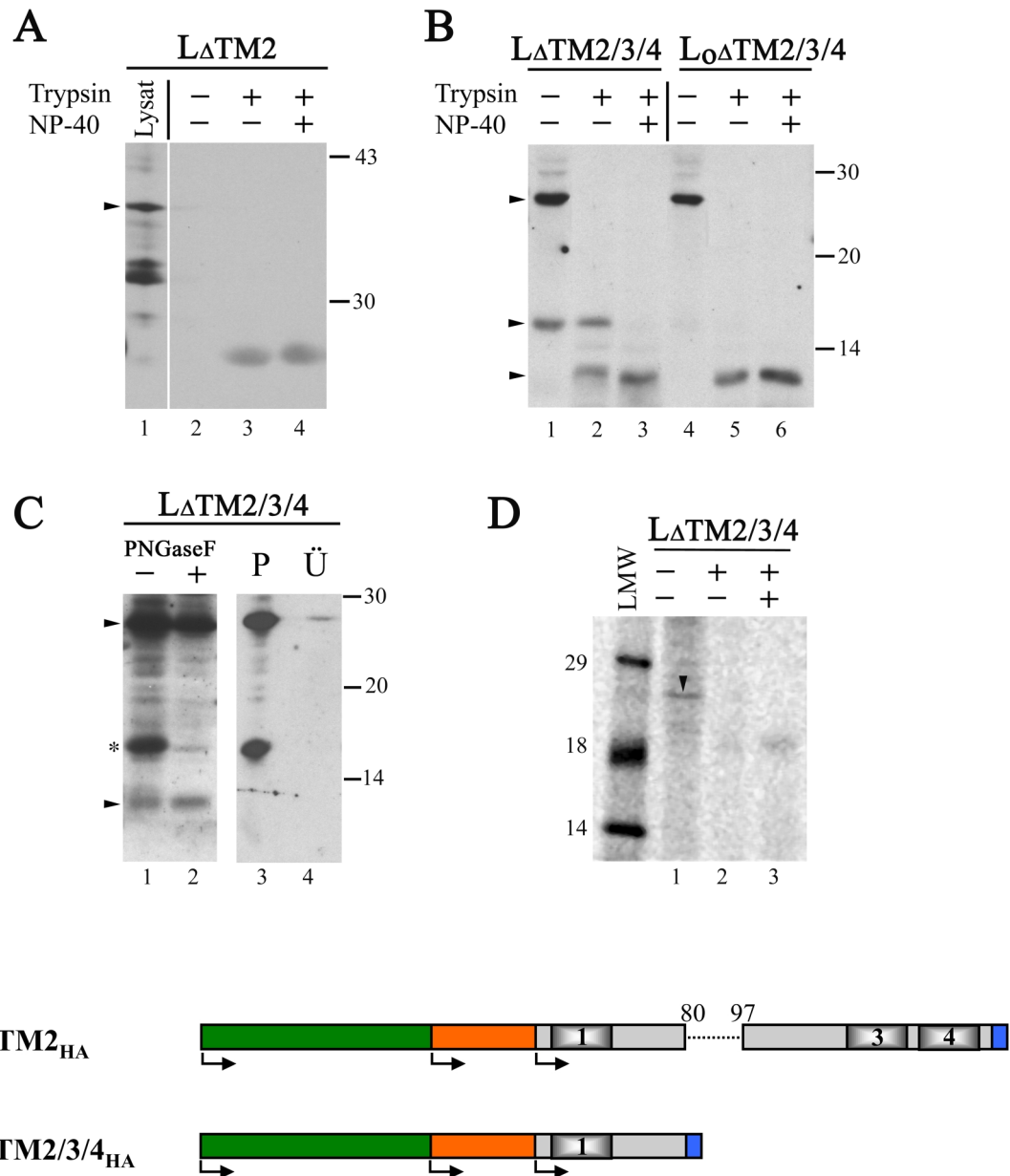


Abb. 13: Die Bedeutung einzelner TM für die posttranslationale präS-Translokation: TM2 ist notwendig.

(A-C) COS7-Zellen wurden mit den angegebenen L-Mutanten transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden Mikrosomen präpariert mit denen Trypsinschutzversuche durchgeführt wurden (A und B) (s. Legende von Abb. 8, 9 und 10). Die Pfeile markieren die L- und M- Proteine. (C) Die Mikrosomen der transfizierten Zellen wurden mit PNGaseF behandelt (links) oder einer Natriumcarbonat-Extraktion unterzogen (rechts). Der Pfeile markieren nichtglykosylierte L- und M-Formen, während die glykosylierte M-Form durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet ist. (D) COS7-Zellen wurden mit der Mutante L Δ TM2/3/4 transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte eine radioaktive, metabolische Markierung (20 min) der Proteine und nachfolgend ein Trypsinschutzversuch. Nach Immunpräzipitation mit einem präS1-spezifischen Antiserum und Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE erfolgte die Analyse mit einem PhosphorImager. Der Pfeil kennzeichnet die L-Mutante. Molekulargewichte (kDa) mitgeführter Markerproteine sind jeweils rechts (in (D) links) gekennzeichnet. (E) Schematische Darstellung der Domänenstruktur verwendeter L-Mutanten (s. Legende von Abb. 9).

Um auszuschließen, daß das Verschwinden der 28 kDa-Bande der Mutante $L\Delta TM2/3/4$ bei Proteolyse von intakten Mikrosomen (Abb. 13B, Spuren 2 und 5) möglicherweise auf einer Abspaltung des C-terminalen HA-Epitops beruhte, wurde zusätzlich ein Proteaseschutzversuch durchgeführt, in dem die Mutante durch radioaktive Markierung und präS1-spezifische Immunpräzipitation detektiert wurde. Wie erwartet, trat auch in diesem Ansatz die Mutante als 28 kDa-Protein auf (Abb. 13D, Spur 1). Entscheidend war jedoch der Befund, daß die Trypsinbehandlung bei intakten Mikrosomen auch hier eine völlige Abspaltung der präS-Domäne bewirkte (Abb. 13D, Spur 2), so daß die Daten der Western-Blot-Analysen bestätigt wurden.

Im Gegensatz zur oben beschriebenen Mutante $L\Delta TM3/4$, war die Mutante $L\Delta TM2/3/4$ offensichtlich unfähig, die präS-Domäne posttranslational zu translozieren. Diese Daten wiesen folglich auf eine essentielle Rolle von TM2 während der topologischen Reorientierung des L-Proteins.

1.1.6 Die hydrophobe Transmembrandomäne TM2 des L-Proteins ist für die präS-Translokation ausreichend

Um die wichtige Rolle von TM2 weiterführend zu untersuchen, wurde eine L-Mutante konstruiert, in der alle Transmembranbereiche außer TM2 deletiert wurden ($L\Delta TM1/3/4$). Nach Expression in COS7-Zellen wurde die Mutante als 29 kDa-Protein in der mikrosomalen Fraktion nachgewiesen (Abb. 14, Spur 1), was zeigte, daß das Protein effizient in die Membran eingelagert wurde. Der Trypsinschutzversuch ergab einen deutlichen partiellen Proteolyseschutz (Abb. 14, Spur 2), was darauf hinwies, daß die präS-Region in das mikrosomale Lumen transloziert wurde. Auch bei dieser Mutante wurde die interne Initiation und somit die Koexpression der M- und S-Produkte durch Mutation der spezifischen Startkodons unterbunden. Zu beachten ist, daß dabei zusätzlich 18 Aminosäuren der ersten hydrophilen Schleife deletiert wurden (Abb. 7), so daß die $L_0\Delta TM1/3/4$ -Mutante etwa 2 kDa kleiner als die Mutante $L\Delta TM1/3/4$ ist. Auch mit dieser Mutante wurde deutlicher Trypsinschutz bei intakter mikrosomaler Membran mit gleichzeitigem Auftreten von proteolytischen Spaltprodukten beobachtet (Abb. 14, Spuren 4 und 5). Demzufolge weist die Mutante $L_0\Delta TM1/3/4$ – ähnlich wie das Wildtypprotein - eine duale Topologie auf. Dies zeigt, daß TM2 nicht nur notwendig für die partielle Translokation der präS-Region, sondern auch ausreichend ist.

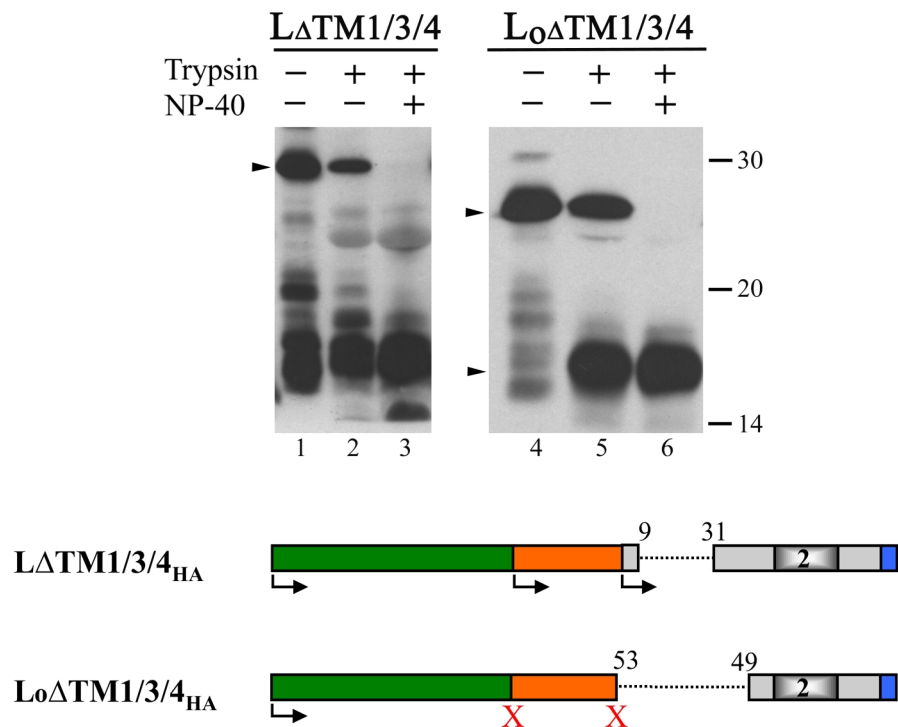


Abb. 14: TM2 ist für die präS-Translokation ausreichend.

COS7-Zellen wurden mit L Δ TM1/3/4 oder L Δ TM1/3/4_{HA}, deren interne Translationsstartstellen mutiert sind, transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden Mikrosomen präpariert, die entweder nicht behandelt (-/-) oder mit Trypsin in Abwesenheit (+/-), oder Anwesenheit (+/+) von NP-40 inkubiert wurden. Nach SDS-PAGE und Western-Transfer wurden die Proteine mit einem HA-spezifischen Antikörper analysiert. Die L-Proteine und die proteolytischen Spaltprodukte der L Δ TM1/3/4-Mutante sind durch Pfeile markiert. Molekulargewichte (kDa) mitgeführter Markerproteine sind rechts gekennzeichnet. Im unteren Teil der Abbildung sind die Domänenstrukturen der L-Mutanten schematisch dargestellt (s. Legende von Abb. 9 und 12).

Um zu bestätigen, daß die präS-Translokation der L Δ TM1/3/4-Mutante posttranslational erfolgte, wurde die Kinetik der präS-Reorientierung untersucht. Dazu wurde in Anlehnung an das Protokoll von Prange und Streeck (1995) eine metabolische Pulse-Chase-Markierung durchgeführt und die Topologie der Mutante mittels Trypsinschutzversuch analysiert. In Übereinstimmung mit den für das L-Wildtypprotein beschriebenen Befunden (Prange und Streeck, 1995) wurde beobachtet, daß die Population von L Δ TM1/3/4-Molekülen, die in der 10-minütigen Pulse-Phase synthetisiert wurden, gegenüber einer tryptischen Spaltung vollständig sensitiv war. Erst in einer 45-minütigen Chase-Phase erwarb diese Population die typische partielle Resistenz gegenüber Trypsin. Dieses Ergebnis bestätigte eindeutig den posttranslationalen präS-Translokationsmodus der Mutante L Δ TM1/3/4.

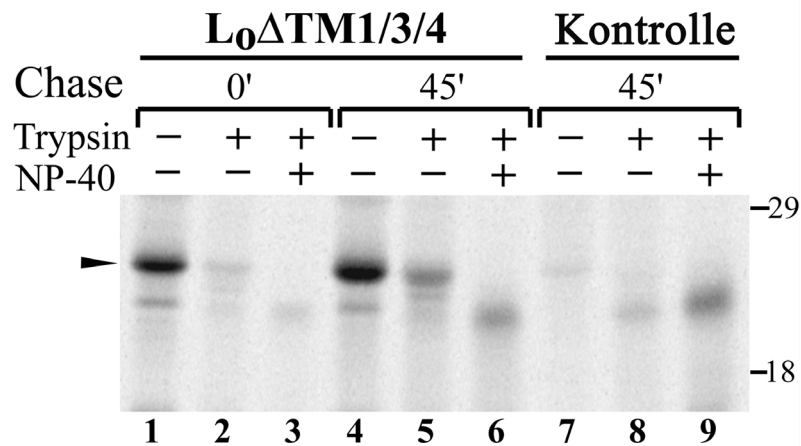


Abb. 15: Die präS-Translokation der Mutante L₀ΔTM1/3/4 erfolgt posttranslational.

Untersuchungen zur Topologie und Reifung der Mutante L₀ΔTM1/3/4 mittels metabolischer Pulse-Chase-Markierung und Trypsinschutzversuch. Transfizierte COS7-Zellen wurden für 10 min radioaktiv markiert und entweder direkt (Spuren 1-3) oder nach einer Chase-Phase von 45 min (Spuren 4-9) lysiert. Nach Trypsinschutzversuchen von Mikrosomen (s. Legende von Abb. 9) wurden die Proteine mit einem präS1-spezifischen Antiserum immunpräzipitiert. Als Kontrolle für unspezifische Immunpräzipitationen wurden nichttransfizierte Zellen mitgeführt (Spuren 7-9). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch einen PhosphorImager dargestellt. Molekulargewichte (kDa) mitgeführter Markerproteine sind rechts gekennzeichnet.

1.1.7 Die hydrophobe Transmembrandomäne TM2 des L-Proteins kann durch eine fremde Transmembrandomäne nicht ersetzt werden

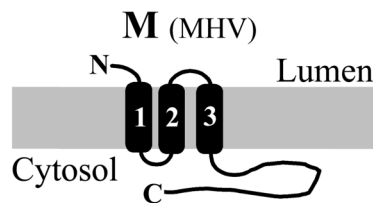
Um der Frage nachzugehen, ob die hydrophobe TM2 per se für die posttranslationale präS-Translokation essentiell ist, oder ob sie vielmehr durch einen anderen hydrophoben Membrananker ersetzt werden kann, sollte eine chimäre L-Mutante erstellt werden. Für den Austausch der S-Domäne im L-Protein gegen eine strukturell ähnliche Domäne wurde das M-Hüllprotein des Maus-Hepatitis-Virus (MHV) gewählt. MHV, ein Mitglied der Familie der Coronaviren, kodiert u.a. das M-Hüllprotein, ein Membranprotein mit drei Transmembrandomänen (Abb. 16A). Die Membranintegration dieses Proteins erfolgt ähnlich wie die des HBV S-Proteins mit Hilfe einer Signal-Ankerdomäne (TM1) und einer Stop-Transferregion (TM2) (Locker *et al.*, 1992). Aufgrund dieser strukturellen Homologie wurde die S-Region in L durch die ersten beiden Transmembrandomänen des MHV M-Proteins ersetzt (Abb. 15 A und D).

Nach Expression der hergestellten Mutante L::MHV in COS7-Zellen wurde das chimäre, HA-markierte Protein mit einem Molekulargewicht von 28 kDa detektiert (Abb. 16B, Spur 1), was dem errechneten Molekulargewicht des nichtglykosylierten Proteins entspricht. Der

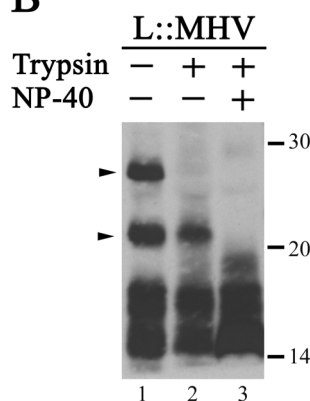
PNGaseF-Verdau bestätige eine fehlende N-Glykosylierung der L-Chimäre (Abb. 16C, Spuren 1 und 2), während der Nachweis von L::MHV in der mikrosomalen Fraktion eine stabile Membranintegration des Proteins anzeigte. Gleichzeitig trat durch interne Initiation innerhalb der präS-Domäne ein M::MHV-Produkt mit einer Größe von 21 kDa auf. Hier zeigte jedoch die Behandlung mit PNGaseF, daß dieses Produkt N-Glykane trug, die durch das Enzym spaltbar waren (Abb. 16C, Spuren 1 und 2). Wichtiger jedoch war der Befund, daß die präS-Domäne der L::MHV-Chimäre gegenüber einer Spaltung mit Trypsin vollständig sensitiv, die des M::MHV-Konstrukts hingegen vollständig resistent war.

Diese Daten verdeutlichten, daß die zwei Transmembrandomänen des MHV M-Proteins zwar eine kotranslationale Translokation mit einhergehender N-Glykosylierung der präS2-Domäne von M bewerkstelligen können, eine partielle posttranslationale Translokation der präS-Domäne von L hingegen nicht herbeiführen können. Demzufolge scheint TM2 für den Prozeß der posttranslationalen präS-Translokation nicht nur notwendig und hinreichend zu sein, sondern darüber hinaus auch spezifisch daran beteiligt zu sein.

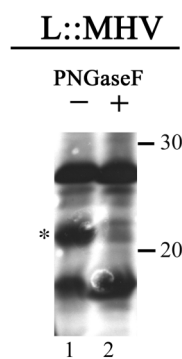
A



B



C



D

L::MHV

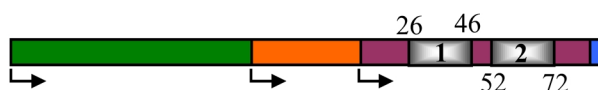


Abb. 16: Coronavirus TM-Segmente sind nicht in der Lage, eine posttranslationale präS-Translokation herbeizuführen.

(A) Modell der MHV M-Topologie innerhalb der ER-Membran. Das Protein weist drei Transmembranregionen auf (Locker *et al.*, 1992). (B) Trypsinschutzversuch (s. Legende von Abb.9 und 10) mit Mikrosomen aus COS7-Zellen, die mit dem L::MHV-Gen transfiziert wurden. Der obere Pfeil markiert das L::MHV-Protein, der untere Pfeil kennzeichnet das intern-gebildete M::MHV-Protein. (C) Behandlung der Mikrosomen aus transfizierten Zellen mit PNGaseF (s. Legende von Abb. 9). Markiert ist hier die N-glykosylierte M::MHV-Form. Molekulargewichte (kDa) mitgeführter Markerproteine sind rechts gekennzeichnet. (D) Schematische Darstellung der Domänenstruktur der L::MHV-Chimäre. Die HBV präS1-Region ist in grün und die präS2-Region in orange dargestellt. Die verwendete MHV-Domäne, welche die ersten beiden TM beinhaltet, ist in violett gezeigt (s. auch Legende in Abb. 9).

1.1.8 Das postulierte präS2-spezifische Translokationsmotiv beeinflusst die präS-Translokation nicht

Im Zuge dieser Untersuchungen wurde eine Arbeit veröffentlicht, die beschreibt, daß ein kurzes α -helikales Peptid innerhalb der präS2-Region die Fähigkeit besitzt, die Plasmamembran von Zellen zu durchdringen und sogar als Transporter für größere Proteineinheiten durch die Zellmembran dienen kann (Oess und Hildt, 2000). Demzufolge wurde dieses Peptid als Translokationsmotiv (TLM) bezeichnet. Die Ergebnisse der Arbeit von Oess führten zu der Hypothese, daß die präS2-Region möglicherweise wesentlich an der posttranslationalen präS-Translokation von L durch intrazelluläre Membranen beteiligt ist. Folglich wurde eine L-Mutante erstellt, die eine Deletion dieses Peptids (Aminosäuren 150-163) trägt. Nachfolgend wurde mittels Trypsinschutzversuchen das Translokationsverhalten dieser Mutante getestet. Wie das L-Wildtypprotein (Abb. 17, Spur 1) trat die Mutante L Δ 150-163 ebenfalls in Form einer Doppelbande auf (Abb. 17, Spur 4). Bedingt durch die Deletion des Motivs wurden die beiden L-Formen mit Größen von 38- und 41 kDa detektiert. Der Trypsinverdau bei intakter Mikrosomenmembran zeigte einen deutlichen Schutz der Mutante L Δ 150-163 (Abb. 17, Spur 5). Da nach Zugabe von Detergenz eine vollständige Spaltung erfolgte (Abb. 17, Spur 6), beruhte der Schutz nicht auf einer intrinsischen Trypsinresistenz, sondern wurde durch Translokation der präS-Domäne in das Lumen der Mikrosomen hervorgerufen. Das Translokationsverhalten dieser Mutante ist daher im Vergleich zum L-Wildtypprotein nicht verändert. Daraus folgt, daß das postulierte Translokationsmotiv offensichtlich keine Rolle bei der präS-Translokation spielt.

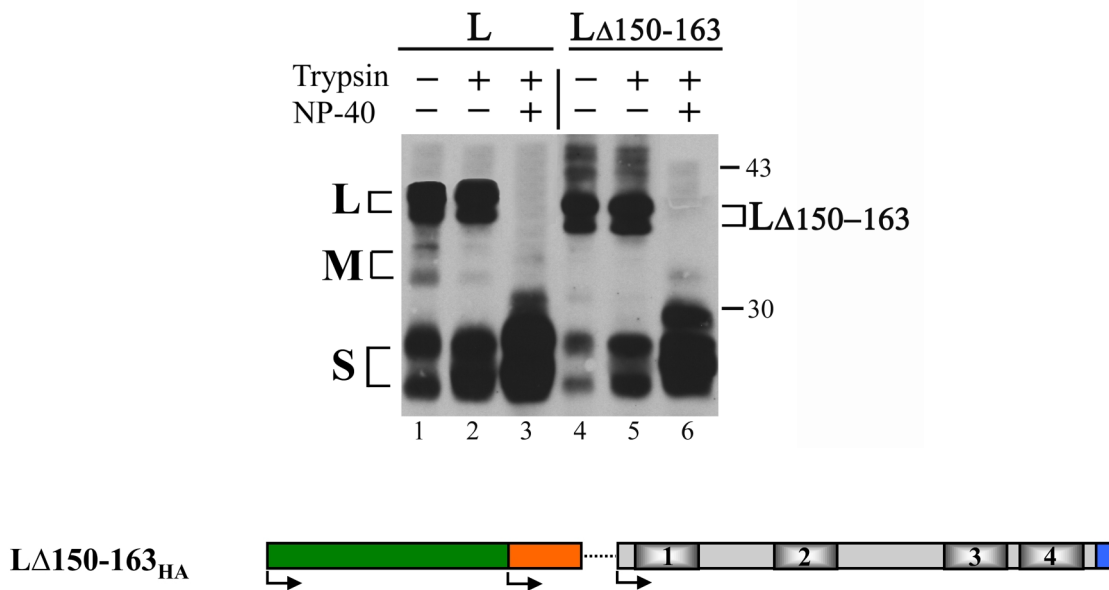


Abb. 17: Das präS2-Translokationsmotiv (TLM) spielt keine Rolle bei der posttranslationalen präS-Translokation von L.

COS7-Zellen wurden mit dem L-Gen (links) oder mit der Mutante LΔ150-163 (rechts) transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden Mikrosomen präpariert, die entweder nicht behandelt (-/-) oder mit Trypsin in Abwesenheit (+/-), oder Anwesenheit (+/+) von NP-40 inkubiert wurden. Nach SDS-PAGE und Western-Transfer wurden die Proteine mit einem HA-spezifischen Antikörper analysiert. Die Hüllproteine mit ihren unterschiedliche N-Glykosylierungsformen sind auf der linken Seite (Spuren 1-3) markiert. Auf der rechten Seite (Spuren 4-6) sind das nichtglykosylierte und glykosylierte mutierte Protein angezeigt. Molekulargewichte (kDa) mitgeführter Markerproteine sind ebenfalls rechts gekennzeichnet. Im unteren Teil der Abbildung befindet sich eine schematische Darstellung der Domänenstruktur der Mutante LΔ150-163 (s. Legende von Abb. 9).

1.2 Das Translokationsverhalten von HBV-DHBV-Chimären

Um weitere Hinweise auf den Mechanismus der posttranslationalen präS-Translokation zu erhalten, wurden chimäre L-Proteine, bestehend aus Teilen des L-Proteins von HBV und des L-Proteins des Entenhepatitis B-Virus (DHBV), bezüglich ihres präS-Translokationsverhaltens getestet. Für das L-Hüllprotein von DHBV ist bekannt, daß es ebenfalls durch partielle posttranslationale präS-Translokation eine duale Topologie ausbildet (Guo und Pugh, 1997; Swameye und Schaller, 1997). Im Unterschied zum HBV L-Protein ist die präS-Translokation bei DHBV jedoch von der gleichzeitigen Synthese des S-Proteins abhängig.

1.2.1 Der Einfluß der DHBV S-Region

Zunächst wurde die gesamte S-Domäne im HBV L-Protein durch die S-Region des DHBV L-Proteins ersetzt. Die Mutante präS_{HBV}S_{DHBV} wurde in COS7-Zellen exprimiert und anschließend die Topologie des chimären Proteins mittels Trypsinschutzversuchen untersucht. Dazu wurden die Produkte zunächst in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel analysiert, um die Polypeptide der L-Mutante ausreichend auftrennen zu können. Die Mutante wurde in drei unterschiedlichen Formen nachgewiesen und trat mit Molekulargewichten von 43, 40 und 36 kDa auf (Abb. 18, Spur 1). Die Deglykosylierung mit PNGaseF zeigte, daß es sich bei den beiden größeren Produkten um N-glykosylierte Formen handelte (Abb. 18, Spuren 4 und 5). Da die S-Domäne von DHBV keine modifizierbare N-Glykosylierungsstelle trägt, mußte es sich hierbei um N-Glykosylierungen innerhalb der präS1- und präS2-Regionen handeln. Gleichzeitig trat durch interne Translationsinitiation die M-Form der Mutante mit einem Molekulargewicht von 28 kDa auf (Abb. 18, Spur 1), die – in Anlehnung an den PNGaseF-Verdau – ein N-glykosyliertes Produkt darstellte (Abb. 18, Spuren 4 und 5). Bei einem Trypsinverdau mit intakten Mikrosomenmembranen waren sowohl die glykosylierten L- als auch M-Formen der Mutante vollständig geschützt (Abb. 18, Spur 2), während die Zerstörung der Membran zum proteolytischen Abbau der Produkte führte (Abb. 18, Spur 3). Die präS-Region der L- und M-Chimären ist folglich einheitlich luminal orientiert, was auf einen kotranslationalen Translokationsmechanismus hinweist. Die N-Glykosylierung der präS-Region der L-Formen unterstützt diese Annahme.

Gleichzeitig wurden die Produkte der Mutante präS_{HBV}S_{DHBV} auch in einem 15%igen Gel analysiert, um kleinere Proteine besser auftrennen zu können. Dabei wurde in geringem Maße ein Protein mit einem Molekulargewicht von 20 kDa identifiziert, bei dem es sich um das nichtglykosylierte DHBV S-Protein handelte, das durch interne Translationsinitiation von dem chimären Konstrukt gebildet wurde (Abb. 18, Spur 6). Wie Abbildung 18 zeigt, konnte dieses Protein bei intakter mikrosomaler Membran ebenfalls nicht durch Trypsin gespalten werden (Abb. 18, Spur 7). DHBV-S besitzt jedoch im Gegensatz zu HBV-S keine intrinsische Trypsinresistenz (Swameye und Schaller, 1997), so daß nach Auflösung der Membran ein Spaltprodukt mit einer Größe von etwa 16 kDa auftrat (Abb. 18, Spur 8).

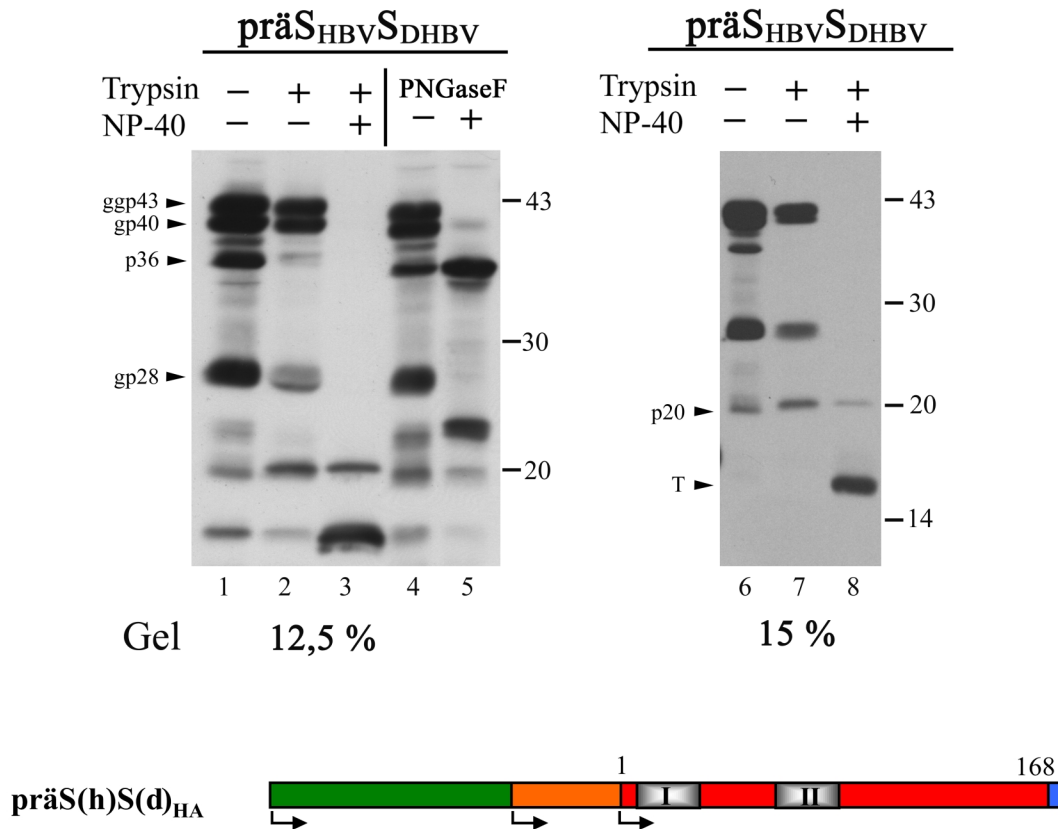


Abb. 18: Analyse der präS-Translokation bei der chimären Mutante präS_{HBV}S_{DHBV}.

Die Mikrosomen transfizierter COS7-Zellen wurden sowohl einem Trypsinschutzversuch unterzogen (Spuren 1-3 und 6-7), als auch mit PNGaseF (Spuren 4 und 5) behandelt (s. Legende von Abb. 9). Die Proteine wurden auf einem 12,5%igen (links) oder einem 15%igen Gel (rechts) aufgetrennt. Die Pfeile markieren die chimären L- (ggp43, gp40 und p36), M- (gp28) und S-Proteine (p20), sowie ein tryptisches Spaltprodukt (T). Der untere Teil der Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Domänenstruktur der L-Chimäre (s. Legende von Abb. 7 und Abb. 9).

Zusammenfassend wurde beobachtet, daß eine Substitution der S-Domäne durch die S-Region des verwandten DHBV, zu einer Veränderung des präS-Translokationsverhaltens führt. Im Gegensatz zur posttranslationalen präS-Translokation bei dem L-Protein von HBV und DHBV, wurde bei der präS_{HBV}S_{DHBV}-Chimäre überraschenderweise eine kotranslationale präS-Translokation beobachtet.

1.2.2 Der Einfluß der DHBV präS-Region

In einem parallelen Ansatz wurde die präS-Domäne des HBV L-Proteins gegen die des L-Proteins von DHBV ausgetauscht (präS_{DHBV}S_{HBV}). Nach Expression dieses Konstrukts in COS7-Zellen wurde beobachtet, daß - vergleichbar zum HBV L-Wildtypprotein - zwei Produkte mit Molekulargewichten von 42 und 39 kDa gebildet wurden (Abb. 19, Spur 1). Wiederum erfolgte eine Behandlung mit PNGaseF, die zeigte, daß die 42 kDa-Form einen N-

Glykanrest trug, während das 39 kDa-Produkt nichtglykosyliert war (Abb. 19, Spuren 4 und 5). Da es sich hier um das HBV L-spezifische Glykosylierungsmuster handelte, kann angenommen werden, daß die beobachtete Modifikation auf einer partiellen Glykosylierung innerhalb der zweiten hydrophilen Schleife der HBV S-Domäne beruhte. Durch die Fusion der DHBV präS-Region mit der HBV S-Domäne entfiel in dieser Chimäre das Startkodon des S-Proteins und da beim DHBV natürlicherweise das Startkodon des M-Hüllproteins fehlt, wurden folglich außer den beiden Formen der L-Chimäre keine weiteren Produkte nachgewiesen. Der Trypsinschutzversuch zeigte, daß die präS-Region beider L-Formen auch ohne die Zugabe von NP-40 vollständig abgespalten wurde (Abb. 19, Spur 2) und somit einheitlich auf der Außenseite der Mikrosomen lokalisiert war. Infolgedessen wurden C-terminale Spaltprodukte in glykosylierter und nichtglykosylierter Form gefunden (Abb. 19, Spuren 2 und 3), was bestätigte, daß eine partielle N-Glykosylierung innerhalb der HBV S-Region der Chimäre präS_{DHBV}S_{HBV} erfolgte. Die Daten wiesen insgesamt darauf hin, daß bei der chimären L-Mutante präS_{DHBV}S_{HBV} eine Translokation der DHBV präS-Domäne weder ko- noch posttranslational durchgeführt werden kann.

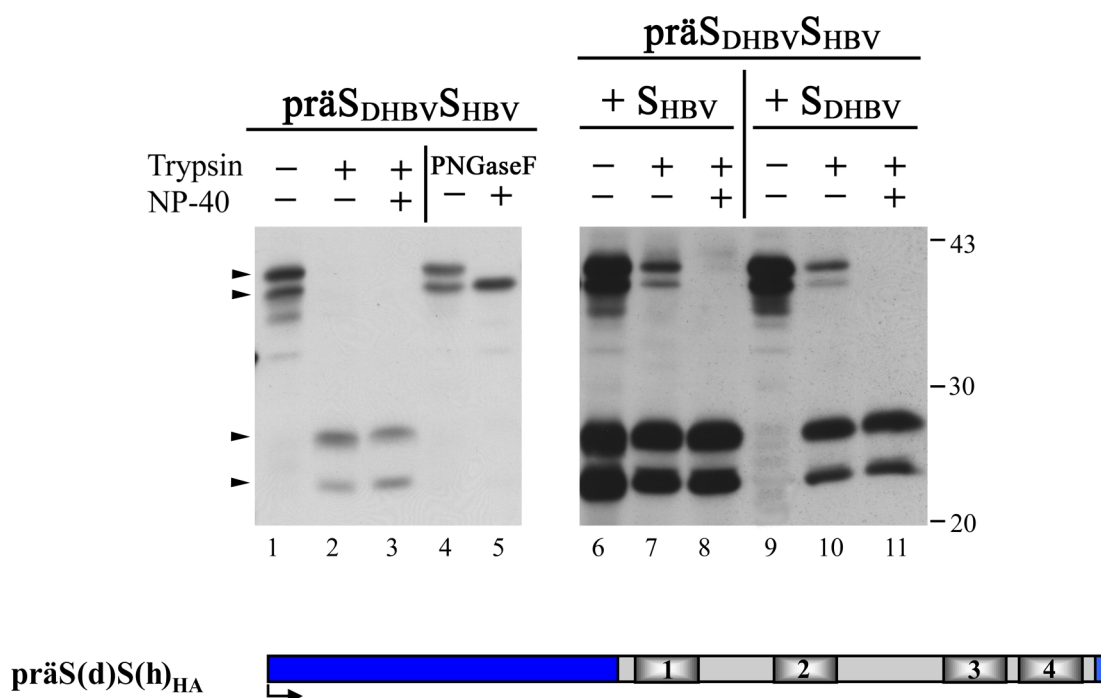


Abb. 19: Analyse der präS-Translokation bei der chimären Mutante präS_{DHBV}S_{HBV}.

COS7-Zellen wurden entweder mit der präS_{DHBV}S_{HBV}-Mutante allein (Spuren 1-5) oder zusammen mit dem S_{HBV}- (Spuren 6-8) bzw. S_{DHBV}-Gen (Spuren 9-11) kotransfiziert. Mit den Mikrosomen transfizierter Zellen wurde ein Trypsinschutzversuch oder ein Verdau mit PNGaseF (Spuren 4 und 5) durchgeführt (s. Legende von Abb. 9). Die Pfeile markieren die chimären L-Proteine und deren tryptische Spaltprodukte. Molekulargewichte (kDa) mitgeführter Markerproteine sind rechts gekennzeichnet. Der untere Teil der Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Domänenstruktur der L-Chimäre (s. Legende von Abb. 7 und Abb. 9).

Wie oben kurz erwähnt, benötigt die posttranslationale präS-Translokation beim L-Hüllprotein von DHBV die Koexpression des S-Proteins (Grgacic *et al.*, 2000). Da die präS_{DHBV}S_{HBV}-Chimäre aufgrund des fehlenden Startkodons das S-Protein durch interne Initiation nicht exprimieren kann, wurde untersucht, ob eine Kotransfektion des HBV S- oder des DHBV S-Proteins zusammen mit der präS_{DHBV}S_{HBV}-Mutante deren Translokationsverhalten der präS-Domäne verändert. Wie Abbildung 19 zeigt, wurde die L-Chimäre auch unter diesen Bedingungen in glykosylierter und nichtglykosylierter Form synthetisiert (Spuren 6 und 9). Gleichzeitig wurde das koexprimierte HBV S-Protein in Form seiner typischen Doppelbande (24 kDa- und 27 kDa-Proteine) mit Hilfe des HA-spezifischen Antikörpers detektiert (Abb. 19, Spur 6). Da das kotransfizierte DHBV S-Protein jedoch nicht mit dem HA-Epitop markiert war, konnte es nicht durch den HA-Antikörper erkannt werden (Abb. 19, Spur 9). Entscheidend war jedoch der Befund, daß die Kotransfektion sowohl mit dem HBV als auch mit dem DHBV S-Protein zu einem partiellen Trypsinschutz und damit zur partiellen Translokation der DHBV präS-Domäne der präS_{DHBV}S_{HBV}-Chimäre führte (Abb. 19, Spuren 7 und 10). Die Unvollständigkeit des Trypsinschutzes war wiederum daran ersichtlich, daß bei intakter Mikrosomenmembran gleichzeitig auch Spaltprodukte auftraten, die geringfügig größer waren als die beiden Formen des HBV S-Proteins (Abb. 19, Spur 10). Die präS-Domäne des DHBV L-Proteins besitzt ebenfalls zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen, die jedoch nicht modifiziert wurden. Folglich erfolgte die partielle Translokation der präS-Domäne bei dieser L-Chimäre bei Koexpression von S-Molekülen ebenfalls posttranslational.

Zusammenfassend verdeutlichen die vorgestellten Daten zu den HBV-DHBV-Chimären, daß die L-Proteine von HBV und DHBV zur posttranslationalen präS-Translokation offensichtlich unterschiedliche Mechanismen benutzen.

2. Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation der posttranslationalen präS-Translokation von L

Da die bisher beschriebenen Daten die Existenz einer HBV-spezifischen Membranpore nicht unterstützen konnten, wurde die intrazelluläre Lokalisation der posttranslationalen präS-Translokation untersucht, mit dem Ziel, Hinweise für alternative Mechanismen zu gewinnen. In früheren Studien verschiedener Arbeitsgruppen wurde vorgeschlagen, daß die Translokation der präS-Domäne in einem postER-Intermediären Kompartiment stattfindet, da sie nicht zu einer N-Glykosylierung der modifikations-kompetenten präS-Domäne führt (Bruss *et al.*, 1994; Ostapchuk *et al.*, 1994; Prange und Streeck, 1995; Guo und Pugh, 1997; Swameye und Schaller, 1997).

2.1 Intrazelluläre Lokalisation von L nach transienter Expression

Um erste Hinweise von der Verteilung des L-Proteins innerhalb der Zelle zu bekommen, wurden zunächst Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. COS7-Zellen wurden transient transfiziert und das L-Protein nach zweitägiger Expression mit einem präS1-spezifischen, polyklonalen Antiserum und indirekter Immunfluoreszenzmarkierung detektiert. L wurde wesentlich in einem netzartigen Geflecht innerhalb der gesamten Zelle gefunden, wobei es sich aufgrund der Morphologie dieser Struktur und des Syntheseortes von L um das Endoplasmatische Retikulum (ER) handeln dürfte (Abb. 20A). Auffällig war jedoch, daß sich das L-Protein in einer perinukleären Struktur stark ansammelte. Diese Lokalisation erinnerte an eine typische Golgi-Struktur (Presley *et al.*, 1997), weshalb mit Hilfe einer Doppelfärbung eine mögliche Lokalisation des L-Proteins im Golgi-Komplex untersucht wurde. Dazu wurde ein anti-58K-Antikörper verwendet, der spezifisch ein peripheres Membranprotein mit einer Größe von 58 kDa erkennt, das an der zytoplasmatischen Seite des Golgi-Apparates lokalisiert ist. Bei dem Protein handelt es sich um eine Formiminotransferase-Cyclodeaminase (FTCD), ein bifunktionales Enzym, das bei der Modifikation von Tetrahydrofolat beteiligt ist (Bloom und Brashear, 1989; Bashour und Bloom, 1998). Die Immunfluoreszenzanalyse zeigte, daß das 58K-Protein perinukleär in einer punktförmigen Struktur lokalisiert ist (Abb. 20B). Da es sich um ein zelluläres Protein handelt, konnte es in jeder Zelle detektiert werden. Wurden in einer Zelle, die das L-Protein exprimiert, die L- und 58K-spezifischen Fluoreszenzen übereinandergelagert, so zeigte sich eine deutliche

Kolokalisation der beiden Proteine (Abb. 20B). Das L-Protein ist folglich in der Lage, auch in Golgi-Strukturen transportiert zu werden, was bisher unbekannt war.

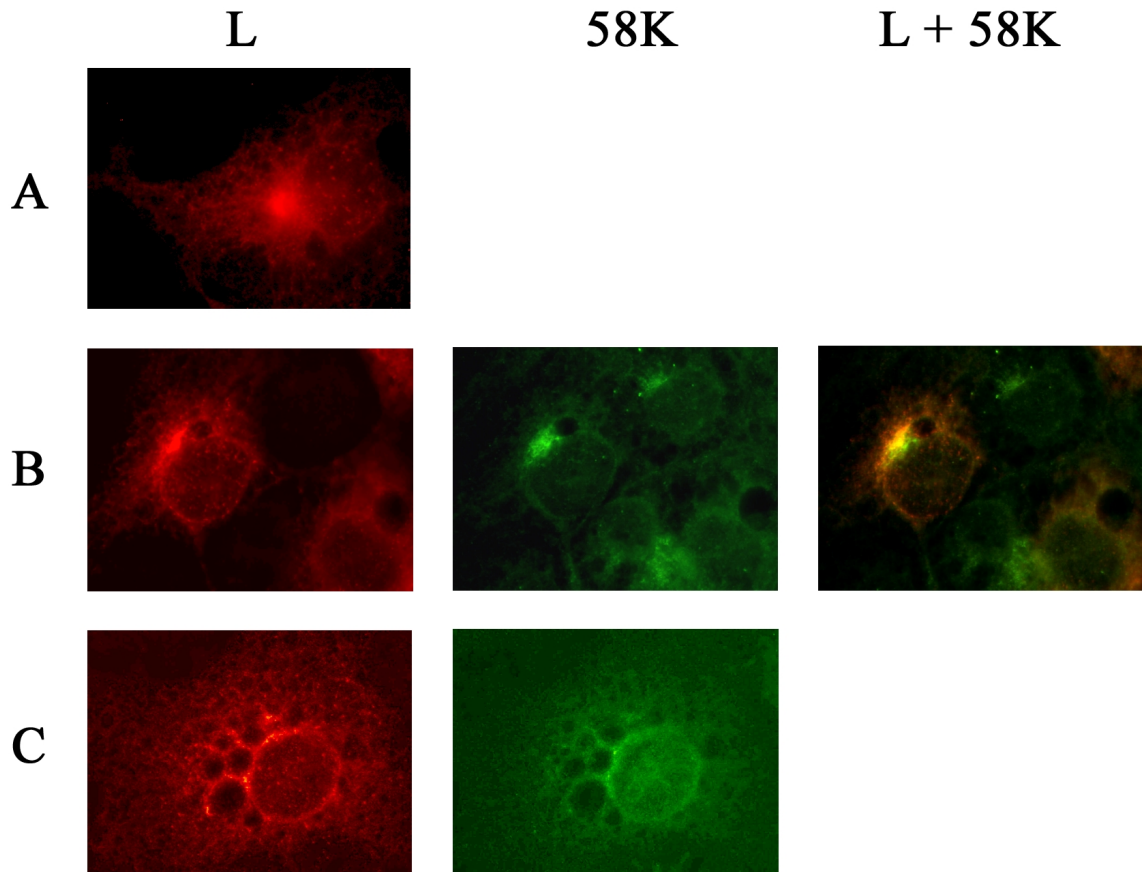


Abb. 20: Intrazelluläre Lokalisation des L-Proteins.

Indirekte Immunfluoreszenzanalyse transfizierter COS7-Zellen. **(A)** Die Lokalisation des L-Proteins wurde nach Fixierung der Zellen mit einem präS1-spezifischen, polyklonalen Antiserum und einem Rhodamin-markierten Sekundärantikörper analysiert. **(B)** Die Zellen wurden nach Fixierung mit einem präS1-spezifischen, polyklonalen Kaninchenantiserum und einem anti-58K monoklonalen Mausantikörper koinkubiert. Die gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe wurden mit einem Rhodamin-markierten anti-Kaninchen- (linkes Bild) bzw. einem DTAF-markierten anti-Mausantikörper (mittleres Bild) detektiert. Im rechten Bild ist eine Übereinanderlagerung der beiden Fluoreszenzen gezeigt. **(C)** Die Zellen wurden während der gesamten Expressionsdauer mit BFA behandelt. Nach der Fixierung wurden sie wie in (B) analysiert.

Um den Befund der Golgi-Lokalisation von L zu untermauern, wurden COS7-Zellen nach transienter Transfektion mit Brefeldin A (BFA) behandelt. BFA ist ein Lacton, das von unterschiedlichen Pilzen synthetisiert wird (Harri, 1963). Die Behandlung von Zellen mit BFA führt zur Auflösung der Membranstrukturen des cis- und medial-Golgi-Apparates. Die Proteine dieser Kompartimente finden sich nachfolgend im ER wieder (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989). Dies führt letztlich zum Verlust der Sekretionsfähigkeit der Zelle. In Immunfluoreszenzstudien, in denen wiederum das L-Protein und das 58K-Protein gleichzeitig markiert wurden, zeigte sich, daß unter dem Einfluß von BFA die perinukleäre, punktförmige Struktur verschwand, und sowohl L als auch 58K vorwiegend im ER lokalisiert waren (Abb. 20C). Die beschriebenen Daten legten nahe, daß das L-Protein den gesamten Sekretionsweg vom ER bis zum cis-Golgi durchlaufen kann. Nachfolgend sollte nun ermittelt werden, in welchem subzellulären Kompartiment die Translokation der präS-Domäne erfolgt.

2.2 Die posttranslationale präS-Translokation von L findet nicht im Golgi-Komplex statt

Zunächst wurde eine mögliche Rolle des Golgi-Komplexes bei der posttranslationalen präS-Translokation untersucht. Hierzu wurde die Expression und Reifung des L-Proteins unter dem Einfluß von BFA getestet. Wie oben dargelegt, führt BFA zur Auflösung des Golgi-Apparates und damit zur Hemmung der Sekretion. Folglich wurde die Wirkung von BFA anhand der Sekretion des S-Proteins kontrolliert. COS7-Zellen, die mit S transfiziert werden, sezernieren normalerweise das S-Protein in großen Mengen als subvirale Partikel in den Überstand. Wurden nun transfizierte Zellen während der gesamten Expressionsdauer von S mit BFA behandelt, so konnten keine S-Partikel im Überstand nachgewiesen werden, während ohne BFA-Zugabe das S-Protein effizient sezerniert wurde (Abb. 21A). Dies bestätigte die Wirkung von BFA unter den angewendeten Bedingungen.

Wurde nun die Topologie des L-Proteins nach BFA-Behandlung von Zellen mittels Proteaseschutzversuch untersucht, so zeigte sich auch hier, daß die präS-Region des L-Proteins partiell vor proteolytischer Spaltung geschützt war (Abb. 21B, Spur 5). Vergleichbar zum Kontrollversuch, der ohne die Zugabe von BFA durchgeführt wurde (Abb. 21B, Spuren 1-3), erfolgte die Translokation der präS-Domäne ebenfalls posttranslational, da keine N-

Glykosylierung der präS-Region beobachtet wurde (Abb. 21B, Spuren 4-6). Der Golgi-Komplex ist folglich für die Reorientierung der präS-Domäne entbehrlich.

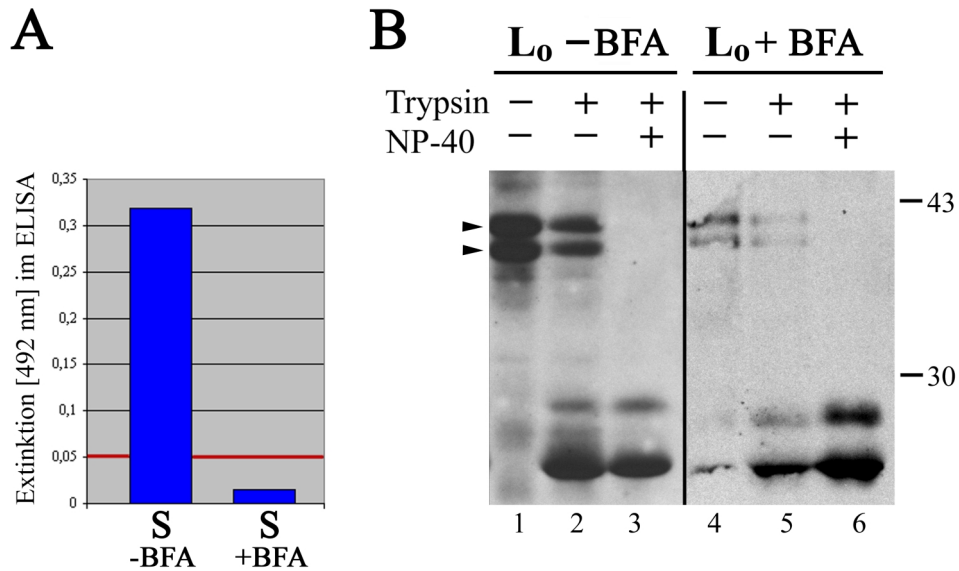


Abb. 21: Der Golgi-Komplex ist für die präS-Translokation entbehrlich.

(A) COS7-Zellen wurden mit dem S-Gen transfiziert und entweder nicht (-BFA) oder während der gesamten Expressionsdauer mit BFA behandelt (+BFA). Nach zwei Tagen wurde mit Hilfe eines S-spezifischen ELISAs die Konzentration des S-Proteins im Zellkulturüberstand ermittelt. Die rote Linie markiert das unspezifische Hintergrundsignal. (B) COS7-Zellen wurden mit dem L_0 -Gen transfiziert und entweder nicht (-BFA) oder während der gesamten Expressionsdauer mit BFA behandelt (+BFA). Nach zwei Tagen wurden Mikrosomen präpariert und ein Trypsinschutzversuch durchgeführt (s. Legende von Abb. 9). Pfeile kennzeichnen das N-glykosylierte und nichtglykosylierte L-Protein. Molekulargewichte (kDa) mitgeführter Markerproteine sind rechts gekennzeichnet.

2.3 Die posttranslationale präS-Translokation von L findet im ER statt

Um den intrazellulären Ort der präS-Translokation eindeutig zu identifizieren, wurden subzelluläre Fraktionen L-transfizierter COS7-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die intrazellulären Membranfraktionen auf einen Nycodenz-Dichtegradienten aufgetragen und durch Ultrazentrifugation getrennt. Nach Fraktionierung des Gradienten wurden die subzellulären Kompartimente mittels spezifischer Antikörper detektiert. Das ER wurde durch einen Antikörper gegen Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), ein lösliches Protein im Lumen des ER, nachgewiesen und in Fraktionen 1 bis 7 gefunden (Abb. 22A). Das Rab2-Protein wurde als spezifischer Marker für das Intermediäre Kompartiment (IC) benutzt. Rab-2 ist eine GTPase, die in prä-Golgi intermediären Strukturen (Vesikel und tubuläre Strukturen) lokalisiert ist (Tisdale *et al.*, 1992), die den Proteintransport vom ER zum Golgi-Komplex vermitteln (Tisdale und Balch, 1996). Das IC wurde in den Fraktionen 9 bis 12 detektiert, wobei es überwiegend in den Fraktionen 10 und 11 vorkam. Als Marker für den Golgi-Komplex wurde das 58K-Protein benutzt, das schon in Abschnitt 2.1 beschrieben wurde. Der Golgi kam in den leichtesten Fraktionen 13 bis 15 vor. Mit dieser Fraktionierung konnte folglich eine gute Auftrennung der intrazellulären Membranstrukturen, die am Proteintransport vom ER zum Golgi beteiligt sind, erzielt werden.

Wurde nun in einem solchen Gradienten nach dem L-Protein gesucht, so zeigte sich, daß es wie erwartet vorwiegend im ER anzutreffen ist, hingegen in nur sehr geringem Maße im IC vorkommt (Abb. 22A). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzanalysen wurde das L-Protein auch in Golgi-Strukturen gefunden. Anschließend wurde dann das L-Protein in der Spitzen-ER-Fraktion (Fraktion 4) im Trypsinschutzversuch untersucht. Diese Analyse zeigte deutlich, daß bei intakter ER-Membran ein partieller Trypsinschutz besteht (Abb. 22B). Die posttranslationale Translokation der präS-Domäne erfolgt demzufolge bereits innerhalb des ER.

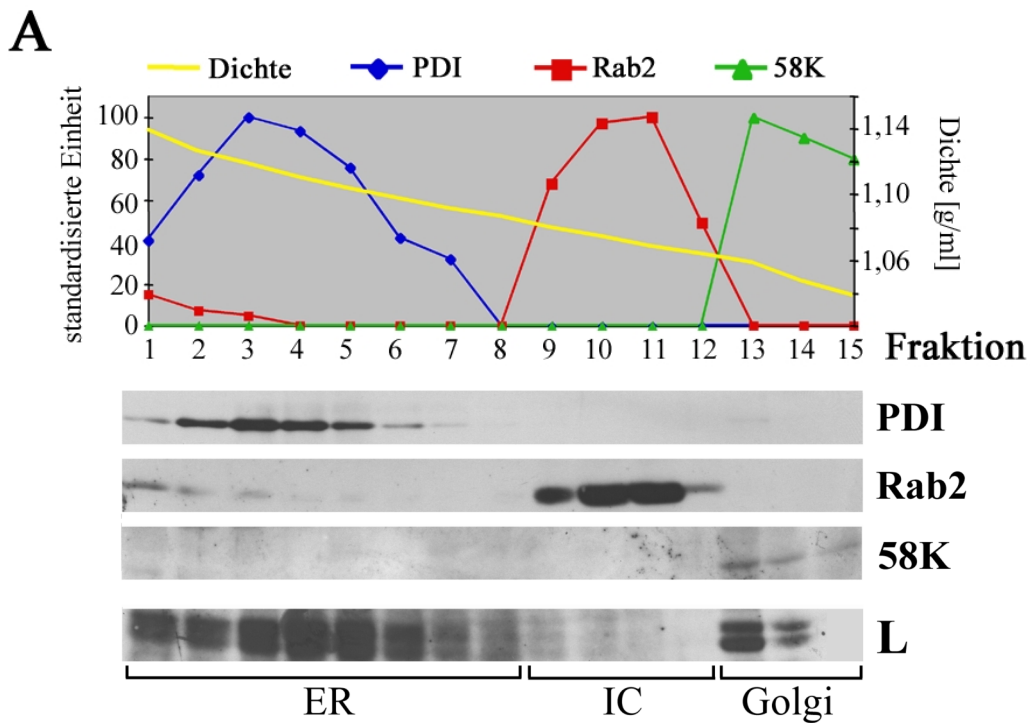


Abb. 22: Die posttranslationale präS-Translokation erfolgt an der ER-Membran.

Zur subzellulären Fraktionierung wurden COS7-Zellen, die mit dem L_o-Gen transfiziert waren, homogenisiert und durch isopyknische Dichtezentrifugation in einem Nycodenz-Gradienten fraktioniert. **(A)** Die einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und bezüglich der Verteilung intrazellulärer Kompartimente mittels Markerprotein-spezifischer Antikörper im Western-Blot analysiert. Als Markerprotein für das ER wurde die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), für das IC das Rab2-Protein (Rab2) und für den Golgi-Komplex das 58K-Protein (58K) ausgewählt. Im oberen Teil der Abbildung ist das abgeleitete Verteilungsprofil der einzelnen Kompartimente (PDI, blau; Rab2, rot; 58K, grün) zusammen mit dem Dichteprofil des Gradienten (gelb) dargestellt. Im unteren Teil wurden die einzelnen Fraktionen hinsichtlich der Verteilung des L-Proteins untersucht. **(B)** Mit den Vesikeln aus der ER-Fraktion 4 wurde ein Trypsinschutzversuch durchgeführt (s. Legende von Abb. 9). N-glykosylierte und nichtglykosylierte L-Moleküle sind markiert.

3. Die Bedeutung wirtseigener Komponenten für die posttranslationale präS-Translokation von L

Die bisher dargestellten Ergebnisse sprechen insgesamt gegen einen Membrankanal, der durch die HBV-Hüllproteine ausgebildet werden könnte. Der Befund, daß die posttranslationale präS-Translokation bereits im ER erfolgt, zusammen mit Arbeiten über den Mechanismus der posttranslationalen Proteintranslokation in Hefezellen (Brodsky *et al.*, 1995; Panzner *et al.*, 1995; Matlack *et al.*, 1997; McClellan *et al.*, 1998), führte zu der alternativen Hypothese, daß das L-Protein möglicherweise das ER-Translokon zur präS-Reorientierung benutzt. Dies würde voraussetzen, daß das L-Protein nach seiner Synthese entweder für längere Zeit mit dem Translokon assoziiert bleibt, oder mit diesem reassoziert. Um zunächst dieser Frage nachzugehen, wurden Untersuchungen zur Extrahierbarkeit des L-Proteins aus Membranen durchgeführt.

3.1 Untersuchungen zur Kinetik der Membranverankerung von L

Der Zeitverlauf der Membranintegration des L-Proteins wurde mittels der Methode der alkalischen Natriumcarbonat-Extraktion untersucht. Mit dieser Technik ist es möglich, jene Membranproteine, die nur peripher mit der Membran assoziiert sind, oder noch nicht vollständig in die Membran eingelagert sind, von jenen zu unterscheiden, die vollständig in der Lipidschicht verankert sind (Fujiki *et al.*, 1982). Dazu wurden zunächst transient-transfizierte COS7-Zellen für 10 Minuten einer radioaktiven Markierung unterzogen. Nach unterschiedlichen Chase-Phasen wurden jeweils Mikrosomen präpariert und mit Natriumcarbonat (pH 11,5) behandelt. Hierbei verbleiben vollständig integrierte Membranproteine in der Pelletfraktion (P), während membranassoziierte und lösliche Proteine in den Überstand (S) abgegeben werden. Wurde in diesem Ansatz das L-Protein untersucht, so zeigte sich, daß selbst 30 Minuten nach Beendigung seiner Synthese etwa 10% der L-Moleküle in der löslichen S-Fraktion auftraten und folglich noch nicht in die ER-Membran integriert waren (Abb. 23A, Spuren 1 und 2). Als Kontrolle wurde im gleichen Versuchsansatz anschließend das residente ER-Membranprotein Calnexin untersucht. Wie Abbildung 23B zeigt, wurde dieses Protein sehr schnell und effizient aus dem Translokon in die ER-Membran entlassen, da es schon direkt nach seiner Synthese ausschließlich in der Pelletfraktion auftrat (Abb. 23B, Spur1). Um die ungewöhnlich lange Assoziation mit dem ER-Translokon weiterführend zu analysieren, wurde auch das Verhalten der Mutante

$L_o\Delta TM1/3/4$ getestet. Wie schon in Absatz 1.1.6 beschrieben, führt diese Mutante ebenfalls eine posttranslationale präS-Translokation durch. Es zeigte sich auch hier deutlich, daß ein Teil der Moleküle 20 beziehungsweise 30 Minuten nach ihrer Synthese durch alkalische Extraktion in den Überstand übergangen und folglich nicht in die ER-Membran integriert waren (Abb. 23 B, Spuren 6 und 8). Diese Ergebnisse legten nahe, daß sich ein Teil der L-Moleküle auch noch nach Beendigung ihrer Synthese in einer Proteinumgebung - wie zum Beispiel dem ER-Translokon - befinden, die eine transmembrane Translokation der präS-Region ermöglichen könnte.

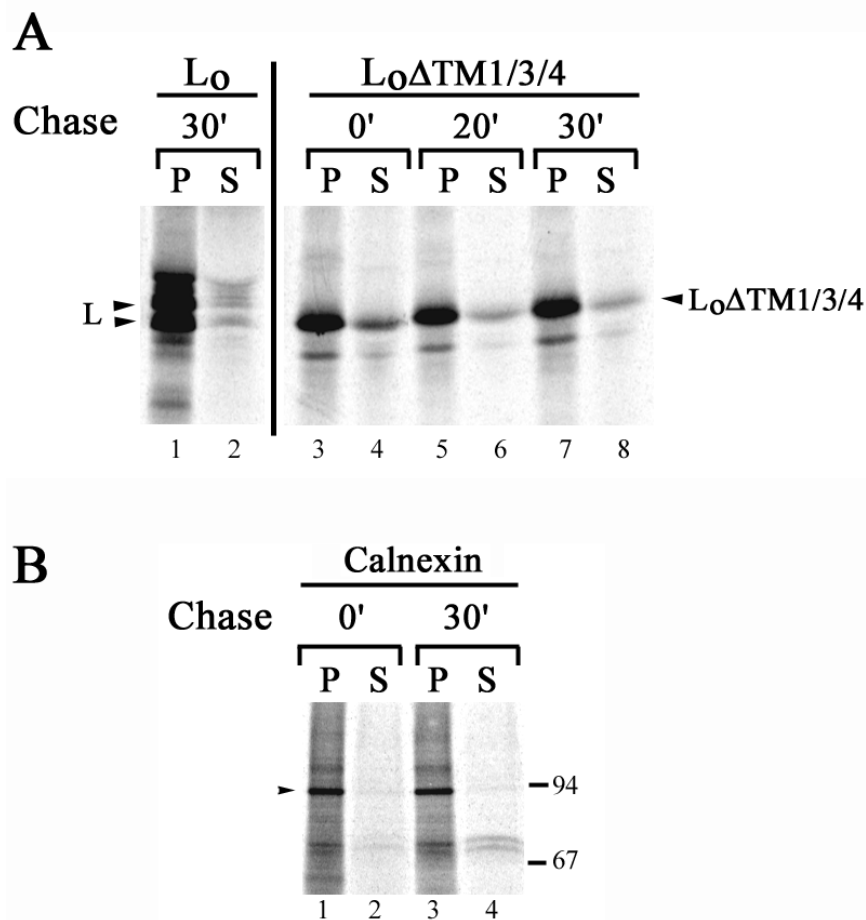


Abb. 23: Analyse der Membranverankerung von L: L ist auch 30 Minuten nach seiner Synthese nicht vollständig in die Lipidschicht integriert.

COS7-Zellen wurden mit der Mutante L_o (A, links) oder $L_o\Delta TM1/3/4$ (A, rechts) transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für 10 min radioaktiv markiert und entweder direkt lysiert (0' Chase) oder anschließend einer Chase-Phase von 20 bzw. 30 min unterzogen. Mikrosomen wurden anschließend mit alkalischer Carbonat-Lösung behandelt. Durch Ultrazentrifugation wurden integrale Proteine (P) von membranassoziierten und löslichen Proteinen (S) getrennt. (A) Die Proben wurden abschließend mit einem präS1-spezifischen Antiserum immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und im PhosphorImager analysiert. (B) Die Proben der Spuren 3, 4, 7 und 8 aus (A) wurden in einer zweiten Analyse mit einem anti-Calnexin-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und ebenfalls mittels SDS-PAGE untersucht. Molekulargewichte (kDa) mitgeführter Markerproteine sind rechts gekennzeichnet.

3.2 Das L-Protein interagiert *in vivo* mit den zellulären Chaperonen BiP, Hsc70 und Hsp40

Die Translokation einer hydrophilen Proteindomäne durch einen Membrankanal in das ER-Lumen erfordert einen Mechanismus, der den gleichzeitigen Fluß von Ionen und die damit verbundene Zerstörung des Membrangradienten verhindert. Untersuchungen zur posttranslationalen Proteintranslokation mittels des Translokons in Hefezellen konnten zeigen, daß intrazelluläre Chaperone sowohl am Transportprozeß selbst als auch am Verschluß der Membran beteiligt sind (Brodsky *et al.*, 1995; Panzner *et al.*, 1995; Matlack *et al.*, 1997; McClellan *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang spielen besonders das konstitutiv-exprimierte, zytosolische Chaperon Hsc70 und das im ER-Lumen lokalisierte BiP-Protein eine Rolle. Deshalb wurde untersucht, ob auch das L-Protein *in vivo* an diese zellulären Chaperone bindet. Um eine mögliche Bindung festzustellen, wurden Koimmunpräzipitationsanalysen durchgeführt, indem COS7-Zellen, die mit dem L_{HA}-Konstrukt transfiziert waren, zunächst unter nichtdenaturierenden Bedingungen lysiert wurden. Das Zellysats wurde anschließend mit monoklonalen Antikörpern, spezifisch für Hsc70 oder BiP, die zuvor an magnetische Partikel kovalent gebunden wurden, inkubiert. Gebundene Proteine wurden in einem Magnetfeld vom übrigen Lysat abgetrennt. Nach mehrfachen Waschschritten wurden abschließend die gebundenen Proteine mittels Gelelektrophorese und Western-Transfer analysiert. Als Kontrollen wurden die magnetischen Partikel mit einem unspezifischen IgG-Antikörper oder nur mit Rinder-Serum-Albumin (BSA) beladen. Die Untersuchung des Zellysats zeigte zunächst, daß durch interne Initiation neben dem L-Protein erwartungsgemäß auch das M- und S-Protein synthetisiert wurde (Abb. 24, Spur 1). Entscheidend war jedoch die Analyse der Immunpräzipitate. Diese wies nach, daß sowohl bei Präzipitation von BiP als auch von Hsc70 eine Kopräzipitation des L-Proteins erfolgte (Abb. 24, Spuren 4 und 5). M- und S-Hüllproteine konnten hingegen nicht nachgewiesen werden, was die Spezifität der Bindungen zwischen dem L-Protein und den untersuchten Chaperonen untermauert. Eine unspezifische Bindung von L an die verwendeten Partikel konnte anhand der mitgeführten Kontrollen ausgeschlossen werden (Abb. 24, Spuren 2 und 3).

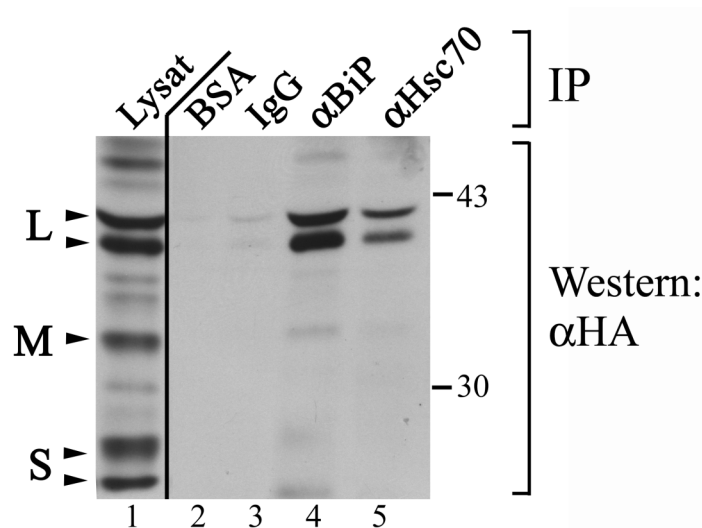


Abb. 24: Das L-Protein interagiert mit Hsc70 und BiP.

COS7-Zellen, die mit dem L_o-Gen transfiziert waren, wurden unter nichtdenaturierenden Bedingungen lysiert. Das Lysat wurde entweder direkt durch SDS-PAGE aufgetrennt oder mit magnetischen Partikeln inkubiert, an die entweder BSA (Spur 2), ein unspezifischer IgG-Antikörper (Spur 3), ein anti-BiP-Antikörper (Spur 4) oder ein anti-Hsc70-Antikörper (Spur 5) kovalent gebunden waren. Nach erfolgter Immunpräzipitation (IP) wurden die Partikel mit Hilfe eines Magneten separiert, gewaschen und die gebundenen Proteine in einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach Western-Transfer wurde der Blot mit einem HA-spezifischen Antikörper analysiert. Molekulargewichte (kDa) mitgeführter Markerproteine sind rechts gekennzeichnet.

Analysen im Hefesystem zeigten ebenso, daß die posttranslationale Proteintranslokation neben dem zytosolischen Chaperon Hsc70 auch das Kochaperon Hsp40 benötigt (McClellan et al., 1998). Folglich wurde geprüft, ob Hsp40 auch an der Interaktion von Hsc70 mit dem L-Protein beteiligt ist. Dazu wurde zunächst - wie oben beschrieben - eine Kopräzipitation des L-Moleküls mit einem Hsc70-spezifischen Antikörper durchgeführt. Nachdem die Bindung von L im Western-Blot bestätigt war (Abb. 25), wurde die Nitrozellulosemembran anschließend sowohl mit einem Hsc70-spezifischen als auch einem Hsp40-spezifischen Antikörper analysiert. Wie erwartet, wurde Hsc70 als Antigen des kovalent-gebundenen Antikörpers spezifisch an die magnetischen Partikel gebunden und als 73 kDa-Bande detektiert. Wichtiger jedoch war der Befund, daß auch das Helferchaperon Hsp40 zusammen mit L kopräzipitiert wurde. Es trat deutlich als 40 kDa-Bande im Immunpräzipitationsansatz auf (Abb. 25, Spur 3). Hsp40 ist folglich Bestandteil des L-Hsc70-Komplexes.

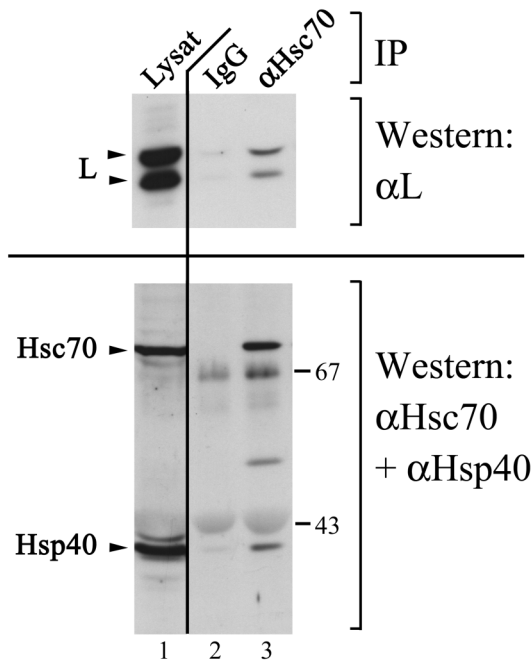


Abb. 25: Hsp40 ist an der Interaktion von L mit Hsc70 beteiligt.

Im oberen Teil der Abbildung wurde eine Koimmunpräzipitation von L durchgeführt, wie sie in der Legende von Abb. 24 beschrieben ist. Im unteren Teil der Abbildung wurde die Nitrozellulosemembran nach erfolgter Detektion von L in einem zweiten Schritt gleichzeitig mit monoklonalen Antikörpern spezifisch für Hsc70 und Hsp40 analysiert.

In einem weiteren Kontrollansatz wurde die Nitrozellulosemembran nach erfolgter Koimmunpräzipitation des L-Proteins in einer zweiten Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Hsc70 und BiP gleichzeitig inkubiert. Dabei konnte wiederum - wie erwartet - festgestellt werden, daß sowohl BiP (78 kDa) als auch Hsc70 (73 kDa) effizient durch die Immunpräzipitation isoliert wurden (Abb. 26). Überraschenderweise wies jedoch das Präzipitat mittels monoklonalen BiP-Antikörpern auch eine Bande auf der Höhe von Hsc70 auf (Abb. 26, Spur 4). Dabei muß es sich jedoch nicht unbedingt um Hsc70 handeln, da potentiell auch Abbauprodukte von BiP detektiert wurden. Im Hsc70-Ansatz wurde kein BiP-Protein nachgewiesen (Abb. 26, Spur 5).

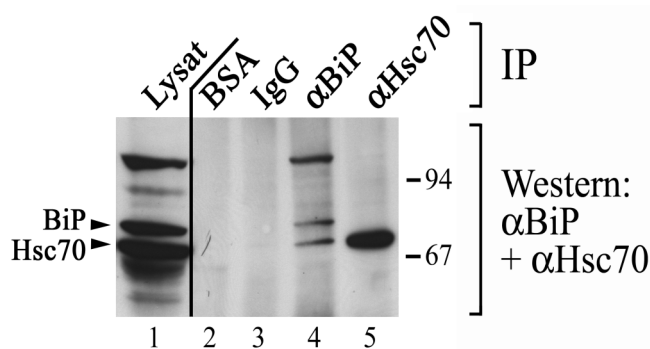


Abb. 26: Analyse des L-BiP- und L-Hsc70-Komplexes.

Es wurde zunächst eine Koimmunpräzipitation von L durchgeführt, wie sie in der Legende von Abb. 24 beschrieben ist. Danach wurde die Nitrozellulosemembran gleichzeitig mit monoklonalen Antikörpern spezifisch für Hsc70 und BiP analysiert. Die Proteine BiP und Hsc70 sind durch Pfeile markiert. Molekulargewichte (kDa) mitgeführter Markerproteine sind rechts gekennzeichnet.

4. Untersuchungen zur Rekonstitution der posttranslationalen präS-Translokation *in vitro*

Um den Mechanismus der posttranslationalen präS-Translokation vollständig aufklären zu können, wäre es wünschenswert, diesen isoliert von der zellulären Umgebung zu untersuchen. Erst in dieser Situation sollte es möglich sein, analysierend in den Prozeß einzugreifen, ohne gleichzeitig andere essentielle zelluläre Mechanismen zu beeinflussen. Denkbar ist zum Beispiel ein Einsatz verschiedener Inhibitoren, die im Gesamtsystem nicht oder nur schlecht verwendet werden können, um möglicherweise neue Komponenten zu identifizieren, die an der Translokation beteiligt sind. Daher wurde versucht, den Prozeß der präS-Translokation in einem *In vitro*-System zu analysieren. Dieser Ansatz wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen gewählt (Ostapchuk *et al.*, 1994; Prange und Streeck, 1995), die jedoch feststellen mußten, daß in den verwendeten *In vitro*-Systemen eine Translokation der präS-Domäne des L-Proteins nicht erfolgt. In der vorliegenden Arbeit wurde nun getestet, ob durch den Einsatz eines flexiblen Reticulozytenlysat-Systems Parameter identifiziert werden können, die eine Translokation der präS-Region *in vitro* ermöglichen. Im Vergleich zu den früher verwendeten Ansätzen besteht ein wesentlicher Unterschied dieses Systems darin, daß Versuche ohne die Zugabe von DTT durchgeführt werden können. Zunächst wurde geprüft, ob die HBV S- und L-Proteine in diesem System exprimiert werden. Dazu wurden die entsprechenden mRNAs im „FlexiRabbit“-Reticulozytenlysat-System ohne die Zugabe von DTT translatiert. In den Ansätzen für S und L_o entstand jeweils ein Produkt mit einem Molekulargewicht von 24 kDa bzw. 39 kDa (Abb. 27, Spuren 1 und 5). Aufgrund der Größen handelte es sich um das nichtglykosylierte S- bzw. L-Protein. Die Translation der L-Wildtyp-mRNA führte zusätzlich zur Bildung der nichtglykosylierten M- (30 kDa) und S-Proteine (24 kDa) (Abb. 27, Spur 3). Bedingt durch die Signalsequenzen innerhalb der S-Region führt die Zugabe von Mikrosomen zum Translationsansatz zu einem Einbau der Proteine in die mikrosomale Membran und folglich zu einer partiellen N-Glykosylierung der S-Domäne. Daher wurden unter diesen Bedingungen neben den nichtglykosylierten Produkten die entsprechend einfachglykosylierten L- (gp42; Abb. 27, Spuren 4 und 6) und S- (gp27; Abb. 27, Spur 2) Proteine gebildet. Das M-Protein trat durch zusätzliche N-Glykosylierung innerhalb seiner präS₂-Region sowohl in einfach- (gp33) als auch in zweifachglykosylierter Form (ggp36) auf (Abb. 27, Spur 4). Eine enzymatische Deglykosylierung mit PNGaseF bestätigte das oben beschriebene Glykosylierungsmuster (Abb. 27, Spuren 7-10), da nun nur die nichtglykosylierten Produkte auftraten (Abb. 27, Spuren 8 und 10). Diese Ergebnisse

zeigten, daß die Synthese, kotranslationale Membranintegration und Modifikation der HBV-Hüllproteine *in vitro* die *In vivo*-Situation widerspiegeln.

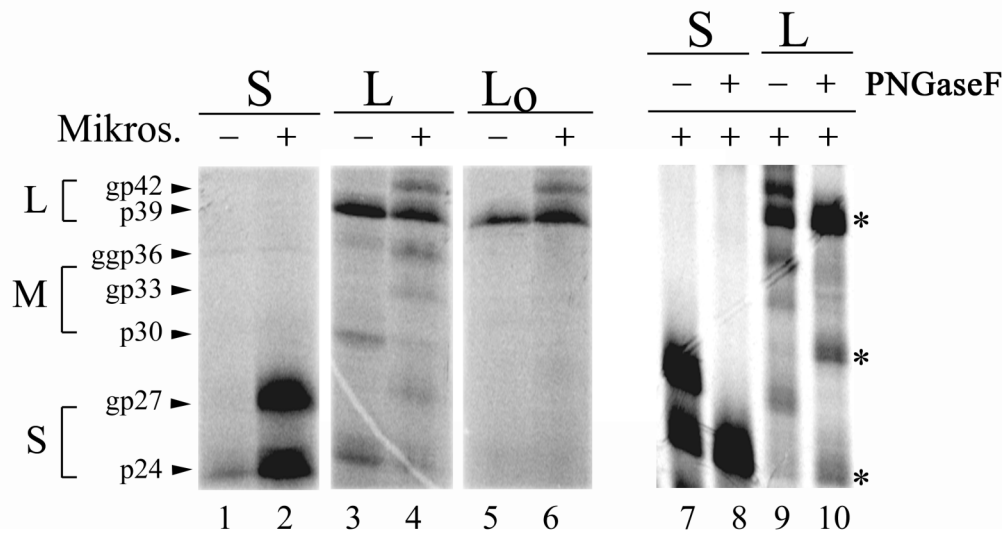


Abb. 27: Analyse des S- und L-Proteins nach *In vitro*-Translation und -Translokation.

Das S- (Spuren 1, 2, 7 und 8), das L- (Spuren 3, 4, 9 und 10) und das L_o-Gen (Spuren 5 und 6) wurden in einem zellfreien Translationssystem entweder in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (+) von Mikrosomen exprimiert. Nach der Synthese wurden die Mikrosomen durch ein Saccharosekissen sedimentiert, um sie von löslichen Proteinen zu trennen. Die Mikrosomen der Spuren 7-10 wurden entweder direkt (Spuren 7 und 9) oder nach der Behandlung mit PNGaseF (Spuren 8 und 10) analysiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem PhosphorImager analysiert. Nichtglykosylierte (p) und glykosylierte (gp, ggp) Formen der Proteine sind links gekennzeichnet. Sternchen (*) auf der rechten Seite kennzeichnen nichtglykosylierte Formen.

Um die Topologie des L-Proteins zu analysieren, wurde zunächst eine *In vitro*-Translation unter Zugabe von Hundepankreas-Mikrosomen durchgeführt und daraufhin ein Trypsinschutzversuch angeschlossen. Als Kontrollprotein wurde der α -Faktor aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht, ein sekretorisches Protein mit einer Größe von 32 kDa, das kotranslational in das Lumen des ER transportiert wird. Dieses Protein zeigte einen Schutz gegenüber der Proteolyse mit Trypsin von etwa 50% (Abb. 28, Spur 2). Die verwendeten Mikrosomen schienen folglich teilweise beschädigt zu sein, so daß - abweichend zu den Herstellerangaben des Systems - nur ein partieller Schutz beobachtet wurde. Entscheidend war jedoch der Befund, daß das L-Protein in diesem System durch Trypsin vollständig gespalten wurde (Abb. 28, Spuren 5 und 8). Die präS-Region von L schien demzufolge einheitlich auf der zytosolischen Seite der Membran lokalisiert zu sein. Abweichend zur *In vivo*-Situation hat eine partielle, posttranslationale Translokation der präS-Region offensichtlich nicht stattgefunden.

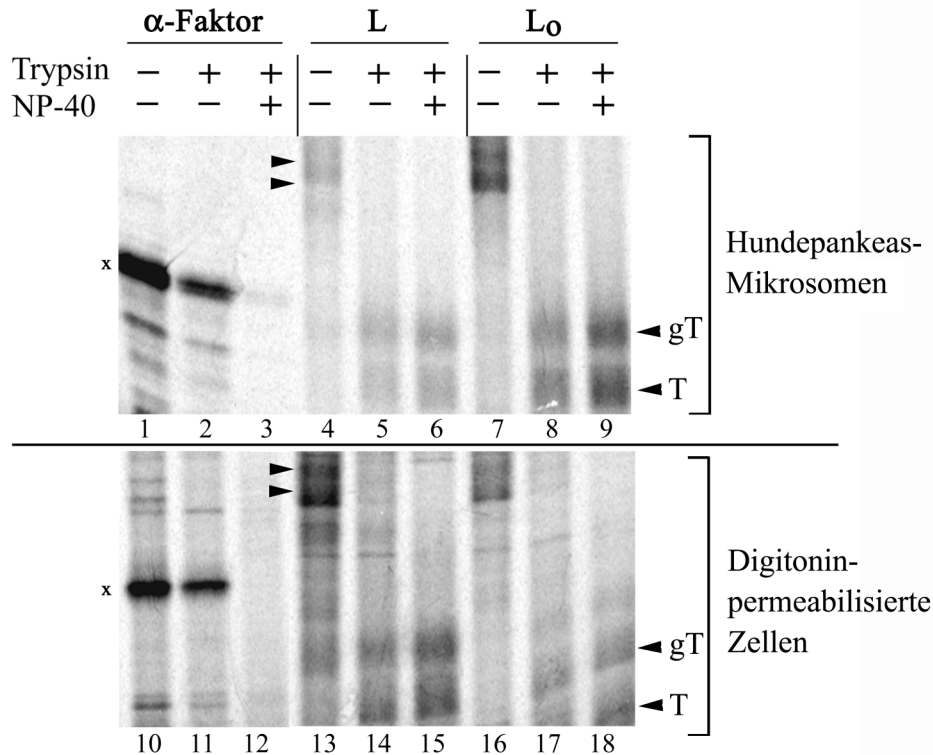


Abb. 28: Analyse der L-Topologie nach *In vitro*-Translation.

Das Gen für den α -Faktor aus *Saccharomyces cerevisiae* (Spuren 1-3 und 10-12), sowie das L- (Spuren 4-6 und 13-15) und das L_o-Gen (Spuren 7-9 und 16-18) wurden in einem zellfreien Translationssystem entweder in Abwesenheit von Mikrosomen (oberer Teil) oder Digitonin-permeabilisierten Zellen (unterer Teil) exprimiert. Nach der Synthese wurden die Mikrosomen bzw. Digitonin-permeabilisierten Zellen durch ein Saccharosekissen sedimentiert, um sie von löslichen Proteinen zu trennen. Es wurde anschließend jeweils ein Trypsinschutzversuch durchgeführt (s. Legende von Abb. 9). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem PhosphorImager analysiert. Nichtglykosylierte und N-glykosylierte Formen des L-Proteins sowie N-glykosylierte (gT) und nichtglykosylierte (T) tryptische Spaltprodukte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Der α -Faktor aus *S. cerevisiae* ist durch ein Kreuz (x) markiert.

Nachfolgend wurde untersucht, ob möglicherweise der Einsatz eines anderen Membransystems eine präS-Translokation *in vitro* herbeiführen kann. Dazu wurden COS7-Zellen verwendet, deren Plasmamembran mittels Digitonin permeabilisiert wurde. Diese Methode läßt intrazelluläre Membransysteme unversehrt, so daß eine effektive Expression von Proteinen weiterhin möglich ist (Wilson *et al.*, 1995). Hierbei zeigte sich, daß sowohl das Kontrollprotein α -Faktor als auch das L-Protein synthetisiert und in mikrosomale Membranen integriert wurden (Abb. 28, Spuren 10, 13 und 16). Jedoch wurde auch in diesem Ansatz die präS-Domäne des L-Proteins vollständig durch Trypsin gespalten und daher nicht in das Lumen des ER transloziert (Abb. 28, Spuren 14 und 17).

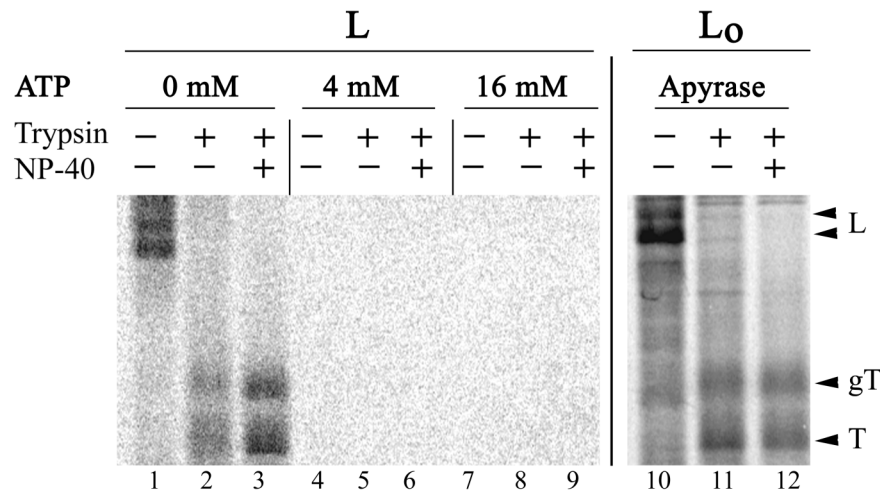


Abb. 29: Analyse der L-Topologie nach *In vitro*-Translation unter ATP-Zugabe bzw. -Depletion.

Das L- (Spuren 1-9) und das L_o-Gen (Spuren 10-11) wurden in einem zellfreien Translationssystem entweder in Anwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen und unterschiedlichen ATP-Konzentrationen (Spuren 1-9) oder unter Zugabe Digitonin-permeabilisierter Zellen und gleichzeitiger ATP-Depletion durch Zugabe des Enzyms Apyrase (Spuren 10-13) exprimiert. Nach der Synthese wurden die Mikrosomen bzw. Digitonin-permeabilisierten Zellen durch ein Saccharosekissen sedimentiert, um sie von löslichen Proteinen zu trennen. Es wurde anschließend jeweils ein Trypsinschutzversuch durchgeführt (s. Legende von Abb. 9). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem PhosphorImager analysiert. Nichtglykosylierte und N-glykosylierte Formen des L-Proteins sowie N-glykosylierte (gT) und nichtglykosylierte (T) tryptische Spaltprodukte sind durch Pfeile gekennzeichnet.

In Abschnitt 3.2 wurde dargelegt, daß das L-Protein *in vivo* an zelluläre Chaperone bindet. Diese Interaktionen könnten auch eine wesentliche Rolle bei der posttranslationalen präS-Translokation spielen. Da die Funktion vieler zellulärer Chaperone durch die Bindung und Hydrolyse von ATP reguliert wird (Ellis, 1997; Bukau und Horwich, 1998; Zimmermann, 1998; Ellis und Hartl, 1999), wurde untersucht, ob die ATP-Konzentration des *In vitro*-Translations-Translokations-Ansatzes einen Einfluß auf die Translokation der präS-Region besitzt. Zunächst wurde das L-Protein unter Verwendung unterschiedlicher ATP-Konzentrationen synthetisiert. Es zeigte sich, daß sowohl bei 4 mM als auch bei 16 mM ATP das L-Protein nicht mehr innerhalb der Mikrosomenfraktion detektierbar war (Abb. 29, Spuren 4-9). In einem anderen Experiment wurde dem Translationsansatz das Enzym Apyrase zugefügt, das die Hydrolyse von ATP zu ADP und weiter zu AMP katalysiert. Jedoch konnte auch nach Reduktion der ATP-Konzentration innerhalb des Translations-Translokations-Ansatzes keine eindeutige Reorientierung der präS-Domäne festgestellt werden (Abb. 29, Spuren 10-12). Es bleibt daher weiterhin offen, warum eine posttranslationale präS-Translokation von L *in vitro* nicht möglich ist. Die Identifizierung der essentiellen Faktoren, die *in vitro* fehlen oder inaktiv sind, würde sicherlich zur Aufklärung des Mechanismus beitragen.

IV. Diskussion

Das große L-Hüllprotein des Hepatitis-B-Virus besitzt eine Schlüsselrolle im viralen Lebenszyklus. Es ist nicht nur an der spezifischen Bindung eines Rezeptormoleküls auf der Oberfläche von Hepatozyten beteiligt (Neurath *et al.*, 1986), sondern es vermittelt auch die Umhüllung der HBV Nukleokapside (Bruss und Ganem, 1991b; Bruss, 1997). Damit ist das L-Protein für die Infektion und Morphogenese von HBV essentiell. Zusätzlich ist es an der Regulierung der intrazellulären cccDNA-Konzentration beteiligt (Summers, *et al.*, 1990) und wirkt als transkriptioneller Transaktivator (Caselmann *et al.*, 1990; Hildt, *et al.*, 1995; Hildt *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997). Entscheidend für diese Multifunktionalität von L ist seine ungewöhnliche duale Topologie (Bruss *et al.*, 1994; Ostapchuk *et al.*, 1994; Bruss und Vieluf, 1995; Prange und Streeck, 1995). Das HBV L-Protein ist das erste Beispiel eines viralen Proteins, das unterschiedliche transmembrane Topologien benutzt, um eine Vielzahl von Funktionen ausüben zu können. Zwar finden sich auch in Säugerzellen einige Membranproteine, wie z.B. Ductin, Aquaporin oder die mikrosomale Epoxidhydrolase, die multiple Topologien ausbilden (Zhang *et al.*, 1993; Dunlop *et al.*, 1995; Levy, 1996; Zhu *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2000), doch das L-Protein zeichnet sich gegenüber diesen vor allem dadurch aus, daß die duale Topologie mit Hilfe einer partiellen posttranslationalen Translokation seiner präS-Domäne herbeigeführt wird (Bruss *et al.*, 1994; Prange und Streeck, 1995). Welcher Mechanismus benutzt wird, um die hydrophile präS-Region von L mit einer Größe von 163 Aminosäuren posttranslational durch die ER-Membran zu translozieren, ist bis heute offen. Sowohl Sequenzanalysen des HBV S-Proteins als auch Untersuchungen zu dem DHBV L-Protein haben zu der Hypothese geführt, daß das S-Protein durch Dimerisierung seiner amphipatischen Transmembrandomänen TM1, TM3 und TM4 in der Lage ist, einen hydrophilen Transmembrankanal mit einem Durchmesser von etwa 15 Å auszubilden, der die posttranslationale Translokation der präS-Domäne ermöglichen könnte. (Stirk *et al.*, 1992; Berting *et al.*, 1995; Guo und Pugh, 1997; Grgacic *et al.*, 2000). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen weisen jedoch insgesamt gegen dieses Modell einer HBV-spezifischen Transmembranpore.

Um die Untersuchungen zur Topologie von L und der Reorientierung seiner präS-Domäne größtenteils ohne die Verwendung radioaktiver Isotope durchführen zu können, wurde das L-Protein - sowie die untersuchten Mutanten - am C-Terminus mit einem HA-Epitop markiert. Dieses Epitop besitzt eine Länge von 11 Aminosäuren und ist mit einem monoklonalen Antikörper in der Western-Blot-Analyse effizient zu detektieren. Es zeigte sich, daß diese

Markierung des L-Proteins keinen Einfluß auf das Translokationsverhalten der präS-Domäne ausübt, weshalb dieser Ansatz eine sinnvolle Untersuchungsmethode für die posttranslationale präS-Reorientierung darstellt. Um die Orientierung (zytosolisch oder luminal) der präS-Domäne bei den untersuchten Proteinen zu ermitteln, wurde der Trypsinschutzversuch als Standardmethode verwendet. Hiermit konnte anhand der Zugänglichkeit von Trypsin sicher analysiert werden, ob bei dem jeweils untersuchten Protein die präS-Region transloziert wurde (Schutz gegenüber Trypsin) oder nicht (Spaltung durch Trypsin). Es galt jedoch zu beachten, daß auch das HA-Epitop durch luminale Orientierung vor Abbau geschützt war, um die Daten eindeutig interpretieren zu können. Daher wurden bei denjenigen Mutanten (L Δ TM2/3/4 und L Δ TM1/3/4), bei denen die Ausrichtung des HA-Epitops unklar war, die Ergebnisse in einem zusätzlichen Versuch kontrolliert, in dem die Proteine radioaktiv markiert und nach dem Trypsinschutzversuch mittels präS1-spezifischer Immunpräzipitation analysiert wurden.

Um eindeutig den posttranslationalen Charakter einer Translokation bestimmen zu können, muß in einem Pulse-Chase-Experiment der Zeitverlauf der Proteinreifung untersucht werden (s. Abb. 15). In der Mehrzahl der hier durchgeführten Experimente wurden die getesteten Mutanten jedoch in einem Gleichgewichtszustand bezüglich ihrer Reifung analysiert. Um dennoch eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Translokation ihrer präS-Region ko- oder posttranslational erfolgte, wurde die Modifikation potentieller N-Glykosylierungsstellen als Marker benutzt. Die Grundlage hierfür ist der Befund, daß N-Glykosylierungsstellen nur kotranslational modifiziert werden können (Nilsson und von Heijne, 1993). Die ausbleibende Modifikation der beiden potentiellen N-Glykosylierungsstellen innerhalb der präS-Domäne (Asn4 in präS1 und Asn4 in präS2) bei gleichzeitigem Trypsinschutz (Translokation) wies folglich auf einen posttranslationalen Translokationsmechanismus hin.

Bisher wurde angenommen, daß die posttranslationale präS-Translokation mit der Virusmorphogenese einhergeht und durch einen HBV-spezifischen Membrankanal ermöglicht wird, der - wie oben beschrieben - durch Dimerisierung des S-Proteins gebildet wird (Stirk *et al.*, 1992; Berting *et al.*, 1995; Guo und Pugh, 1997; Grgacic *et al.*, 2000). Erstaunlicherweise ergab jedoch die Analyse von L-Mutanten, daß die HBV S- und M-Hüllproteine für die posttranslationale präS-Translokation nicht benötigt werden. Vor allem die Unabhängigkeit der präS-Translokation von der Anwesenheit des S-Proteins war insofern bemerkenswert, als das S-Protein der vorherrschende strukturelle Bestandteil der Virushülle ist. Die Daten wiesen folglich darauf hin, daß die Translokation der präS-Domäne im Gegensatz zur bisherigen Annahme unabhängig von der Virusmorphogenese stattfindet. Weiterhin ist dieser Befund

herauszuheben, da andere Arbeitsgruppen für das DHBV L-Protein nachgewiesen haben, daß in diesem Fall die gleichzeitige Expression des S-Proteins für eine Translokation der präS-Domäne von L notwendig ist (Grgacic *et al.*, 2000). Auch im Fall des DHBV L-Proteins wird die präS-Domäne nur von einem Teil der L-Moleküle posttranslational durch die Membran transloziert, so daß auch hier letztlich eine duale Topologie in reifen Virionen vorliegt (Guo und Pugh, 1997; Swameye und Schaller, 1997). Bisher wurde allgemein angenommen, daß das DHBV L-Protein somit ein geeignetes Modell zur Untersuchung der HBV präS-Translokation darstellt. Offensichtlich sollte jedoch ein direkter Vergleich der HBV und DHBV präS-Translokationsmechanismen nur mit Vorsicht angewendet werden.

Obwohl das L-Protein die präS-Translokation unabhängig von anderen viralen Komponenten, insbesondere unabhängig von den beiden anderen viralen Hüllproteinen, ausführt, ist es dennoch denkbar, daß hierzu ein HBV-spezifischer Membrankanal notwendig ist, der durch das L-Protein selbst ausgebildet wird. Eine solche hydrophile Pore könnte durch Dimerisierung der amphipathischen Transmembrandomänen TM1, TM3 und TM4 innerhalb der S-Region von L entstehen und eine posttranslationale Translokation der präS-Domäne herbeiführen (Abb. 30). Unterstützt wird dieses Modell durch den Befund, daß das L-Protein durchaus in der Lage ist, in der Membran des ER mittels Disulfidbindungen L-Homodimere auszubilden (Wunderlich und Bruss, 1996). Dabei scheinen vor allem zwei Cysteinreste innerhalb der luminal orientierten, zweiten hydrophilen Schleife der S-Region (Cys¹²¹ und Cys¹⁴⁷) beteiligt zu sein (Mangold *et al.*, 1997). So wurde auch für andere Proteine eine wichtige Rolle von Disulfidbindungen bei der Ausbildung und Stabilisierung eines Transmembrankanals beschrieben. So bildet das M2-Protein des Influenza-A-Virus einen Ionenkanal aus, der durch pH-Erniedrigung aktiviert werden kann und für Protonen permeabel ist (Holsinger und Lamb, 1991; Sansom *et al.*, 1997). M2 ist ein integrales Membranprotein mit einer Länge von 97 Aminosäuren und einer Transmembrandomäne. Der M2-Membrankanal besteht aus Homotetrameren, die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden (Holsinger und Lamb, 1991). Erstaunlicherweise konnte in den hier durchgeführten Experimenten jedoch klar gezeigt werden, daß die Reorientierung der präS-Region des L-Proteins nicht von der Ausbildung von Disulfidbindungen abhängig ist. Dies ist zwar ein Befund, der ebenso gegen die Existenz eines HBV-spezifischen Transmembrankanals spricht, diesen jedoch immer noch nicht völlig ausschließt, da auch nichtkovalente Wechselwirkungen von Transmembrandomänen eine stabile Membranpore aufbauen können. Beispiele hierfür liefern insbesondere bakterielle porenbildende Proteine, wie z.B. das Alpha-Toxin von

Staphylococcus aureus und das Toxin Streptolysin-O von *Streptococcus pyogenes* (Bhakdi *et al.*, 1996).

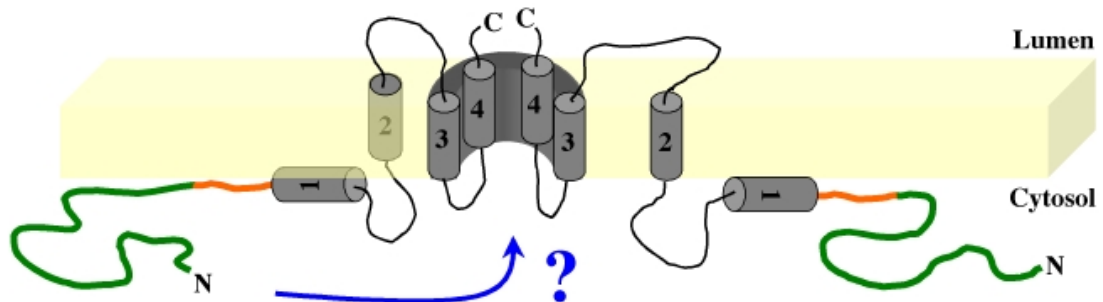


Abb. 30: Modell zur topologischen Reorientierung der präS-Domäne mittels eines L-spezifischen Transmembrankanals.

In diesem Modell wird die Ausbildung einer HBV-spezifischen Pore durch Dimerisierung der amphipathischen Transmembrandomänen innerhalb der S-Region des L-Proteins erklärt. Dieser Transmembrankanal sollte dann in der Lage sein, die präS-Region in das ER-Lumen zu translozieren.

Die Analyse von L-Deletionsmutanten zeigte jedoch deutlich, daß keine der amphipathischen Transmembrandomänen TM1, TM3 oder TM4 des L-Proteins für die posttranslationale präS-Translokation benötigt wird. Vielmehr ist die sehr hydrophobe Transmembrandomäne TM2 für diesen Prozeß ausreichend und essentiell.

So bleibt die Frage, ob TM2 möglicherweise allein eine Transmembranpore ausbilden kann. Beispiele für die Ausbildung eines Transmembrankanals mittels Oligomerisierung ihrer Transmembrandomäne liefern das Phosphoprotein Vpu von HIV-1 (Marassi *et al.*, 1999; Cordes *et al.*, 2001) und das intrazelluläre Protein Phospholamban (PLB). PLB ist ein Transmembranprotein im Sarcoplasmatischen Reticulum des Herzmuskels und bildet mittels disulfidunabhängiger Oligomerisierung einer Transmembrandomäne eine Pore aus (Kovacs *et al.*, 1988). Dieser PLB-Kanal besteht aus einem Homopentamer und ist spezifisch für Ca^{2+} -Ionen permeabel. Mutations- und Spektralanalysen der Transmembrandomäne von PLB wiesen darauf hin, daß der pentamere Kanal durch die spezifische Wechselwirkungen mittels eines Leucinreißverschluß-Motivs (leucine zipper) stabilisiert wird (Arkin *et al.*, 1994; Arkin *et al.*, 1995; Simmerman *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 2000). Charakteristisch für ein solches Leucinreißverschluß-Motiv ist die Wiederholung von Leucinresten im Abstand von sieben Aminosäuren (heptad repeat), wobei eine α -Helix ausgebildet wird, so daß die Leucinreste

auf einer Seite dieser Helix aufgereiht sind (Landschulz *et al.*, 1988). Das Leucinreißverschluß-Motiv scheint auch bei der Homo-Oligomerisierung einer Reihe anderer Proteine wichtig zu sein (Gurezka *et al.*, 1999). Erstaunlicherweise deckt die Sequenzanalyse des L-Proteins ebenfalls ein Leucinreißverschluß-Motiv innerhalb von TM2 auf. Wird TM2 in Form eines helikalen Rades dargestellt, so wird deutlich, daß auch hier die Leucinreste in typischer Weise auf einer Seite der Helix lokalisiert sind (Abb. 30, Position a).

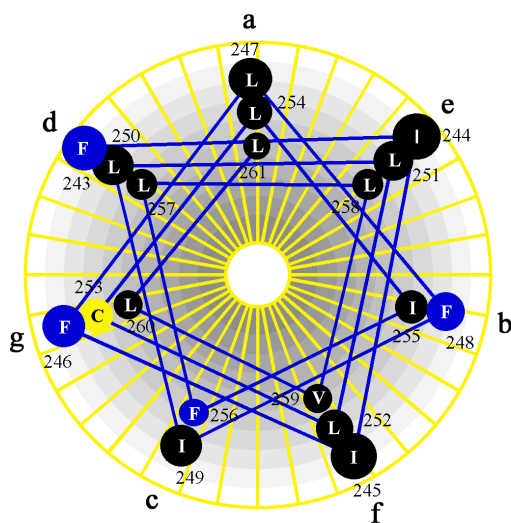


Abb. 31: Helicales Rad von TM2 des L-Proteins.

Aminosäuren (Einbuchstabenkode) der Position 243-261 (TM2) des L-Proteins sind in Form einer Helix mit 3,5 Resten pro Windung angeordnet (Aufsicht). Leucin- (L) und Isoleucinreste (I) des Leucinreißverschluß-Motivs von TM2 sind auf einer Seite der Helix angeordnet (a, d, e) und dadurch möglicherweise in der Lage, mit benachbarten Helices zu interagieren.

Es ist folglich durchaus vorstellbar, daß das L-Protein mit Hilfe von TM2 - vergleichbar zu PLB - eine Transmembranpore ausbilden kann. Aufgrund der starken Hydrophobizität von TM2 (Abb. 32) erscheint es jedoch unwahrscheinlich, daß diese Domäne in der Lage ist, einen Kanal zu bilden, der es erlauben würde, die hydrophile präS-Domäne zu translozieren. In weiterführenden Arbeiten muß daher geklärt werden, ob die Mutante L₀ΔTM1/3/4 überhaupt in der Lage ist, disulfidunabhängige Oligomere auszubilden, und ob die Einführung einer Punktmutation innerhalb des Leucinreißverschlusses, welche die Interaktion benachbarter Leucinmotive inhibiert (Simmerman *et al.*, 1996), einen Einfluß auf die posttranslationale Translokation der präS-Domäne besitzt.

Daß dieses Leucinmotiv innerhalb von TM2 möglicherweise eine wichtige Funktion bei der posttranslationalen Reorientierung der präS-Region ausübt, zeigt der Befund, daß TM2 nicht durch einen anderen hydrophoben Anker ersetzt werden kann. Weder die zweite Transmembrandomäne des Coronavirus MHV M-Proteins (L::MHV-Mutante), noch das TM2-Segment des verwandten DHBV L-Proteins (präS_{HVB}S_{DHBV}-Mutante) waren in der

Lage, eine posttranslationale präS-Translokation durchzuführen. Sequenzanalysen weisen nach, daß beiden Proteinen ein Leucinreißverschluß-Motiv innerhalb ihrer zweiten Transmembrandomäne fehlt.

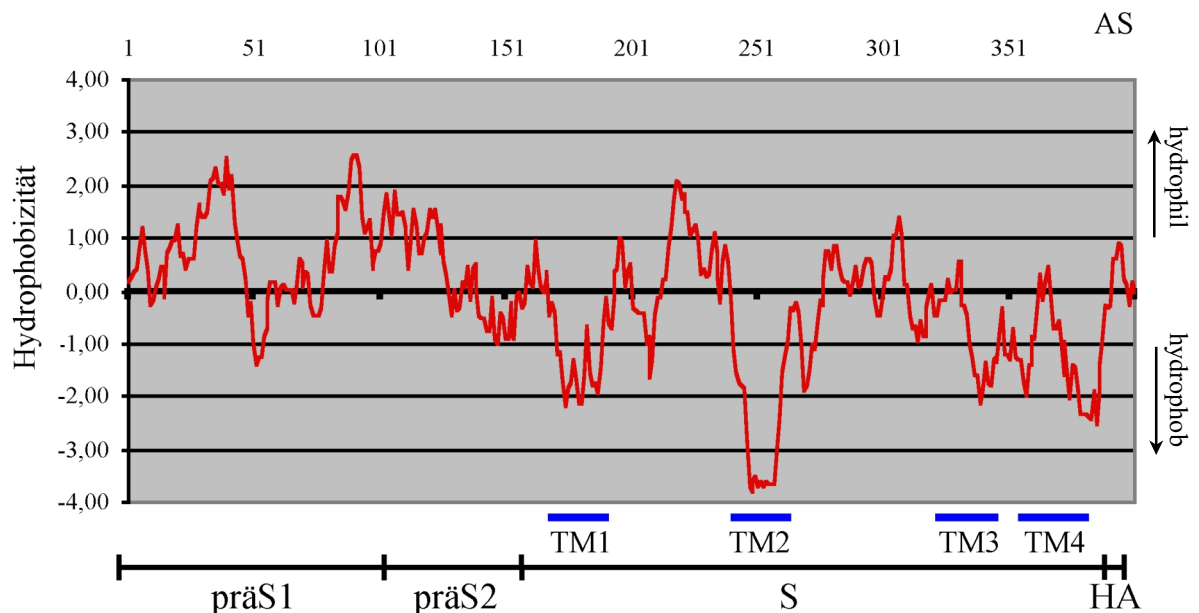


Abb. 32: Hydrophobizitätsdiagramm nach Kyte und Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982) des L_{HA} -Proteins.

Die Grafik zeigt auf der x-Achse die Aminosäure-Positionen des L_{HA} -Proteins und auf der y-Achse den dazugehörigen Hydrophobizitätswert. Hydrophilen Aminosäuren werden bei dieser Methode positive Werte zugeordnet, hydrophoben Aminosäuren negative Werte. Der jeweilige Wert gibt den Grad der Hydrophilität/Hydrophobizität an. Im unteren Teil der Abbildung ist nochmals schematisch die Domänenstruktur des L_{HA} -Proteins mit den zugehörigen Transmembranregionen innerhalb der S-Domäne gezeigt.

Die Analyse der präS-Translokation der Chimäre präS_{HBV}S_{DHBV}, bei der die S-Domäne des HBV L-Proteins durch die entsprechende S-Region des DHBV L-Proteins ersetzt ist, ergab erstaunlicherweise, daß diese Mutante eine kotranslationale präS-Translokation durchführt. Die Funktion zellulärer Chaperone beim Reifungsprozeß von L liefert möglicherweise eine Erklärung für dieses Phänomen. Für die kotranslationale Retention der präS-Domäne des DHBV und HBV L-Proteins im Zytosol scheint wesentlich eine Interaktion mit dem konstitutiv-exprimierten Chaperon Hsc70 nötig zu sein. *In vitro*-Versuche konnten zeigen, daß Hsc70 spezifisch an eine Proteindomäne innerhalb der präS1-Region (im Bereich zwischen Aminosäuren 63-107) bindet (Löffler-Mary, *et al.*, 1997). Auch *in vivo* konnte die Retentionsfunktion dieser Proteinsequenz gezeigt werden. Diese sogenannte zytosolische Verankerungsdomäne (CAD) ist nicht nur in der Lage, die kotranslationale Translokation einer Reporter-Proteinregion zurückzuhalten (Löffler-Mary *et al.*, 1997), sondern nach ihrer

Deletion findet eine kotranslationale präS-Translokation von L statt (Prange und Streeck, 1995). Auch beim DHBV L-Protein konnte eine kotranslationale präS-Translokation durch Deletion der Aminosäuren 10 bis 126 innerhalb der präS-Region herbeigeführt werden (Swameye und Schaller, 1997). Es ist folglich durchaus denkbar, daß bei der chimären Mutante präS_{HBV}S_{DHBV} aufgrund einer veränderten präS-Konformation das Chaperon Hsc70 nicht gebunden werden kann, womit der Mechanismus der zytosolischen präS-Retention inhibiert ist und dadurch eine kotranslationale präS-Translokation erfolgt.

Im Fall des DHBV L-Proteins spielt ein weiteres Sequenzmotiv bei der zytosolischen Retention der präS-Domäne und der damit verbundenen posttranslationalen Translokation eine wichtige Rolle. Es handelt sich dabei um eine Ansammlung von vier positiv geladenen Lysin-Resten am C-Terminus seiner präS-Region, die dem HBV L-Protein fehlt (Swameye und Schaller, 1997). Ein schrittweiser Austausch dieser positiven Ladungen durch ungeladene Aminosäuren führt zu einer fortschreitenden Verlagerung des Translokationsmechanismus von dem ursprünglich posttranslationalen Mechanismus hin zu einer kotranslationalen Translokation mit gleichzeitiger N-Glykosylierung der präS-Region (Swameye und Schaller, 1997). Die Grundlage für die Bedeutung dieser positiven Ladungen könnte möglicherweise die sog. "Positive-Inside-Regel" darstellen, eine Hypothese nach der in polytopen Membranproteinen positiv geladene Aminosäuren tendieren, auf der zytosolischen Seite des ER zu verbleiben (von Heijne 1989). Insgesamt lassen diese Überlegungen deutlich werden, daß die zytosolische Retention der präS-Domäne des L-Proteins ein wichtiger Bestandteil der posttranslationalen präS-Translokation ist.

Ein weiterer bemerkenswerter Befund dieser Arbeit bestand darin, daß auch nach einem Austausch der präS-Region des L-Proteins durch die präS-Domäne von DHBV (präS_{DHBV}S_{HBV}-Mutante) die posttranslationale präS-Translokation nicht länger möglich war. Dies bedeutet, daß die essentielle Rolle von TM2 der HBV S-Region für den Translokationsmechanismus gleichzeitig von der Präsenz der HBV präS-Domäne abhängig ist. Das Ergebnis weist auf eine Interaktion der beiden Domänen bei der Translokation hin. Eine Interaktion von TM2 der HBV S-Domäne mit der DHBV präS-Region ist offensichtlich nicht möglich, da die präS-Domänen des HBV und DHBV L-Proteins keinerlei Sequenzhomologien aufweisen.

Andererseits konnte jedoch eine posttranslationale präS-Translokation der Mutante präS_{DHBV}S_{HBV} durch Kotransfektion mit dem HBV oder DHBV S-Protein wiederhergestellt werden. Damit konnten die Befunde von Untersuchungen beim DHBV L-Protein bestätigt werden, die ergaben, daß das S-Protein eine essentielle Helferfunktion bei der DHBV präS-

Translokation spielt (Grgacic *et al.*, 2000). Möglicherweise handelt es sich bei dieser Helferfunktion um einen Mechanismus, der bei dem HBV L-Protein von TM2 ausgeübt wird. Die Hypothese, daß die S-Proteine - bzw. die S-Domänen innerhalb des L-Proteins - von HBV und DHBV unterschiedlich am Mechanismus der posttranslationalen präS-Translokation beteiligt sind, wird durch Befunde unterstützt, die für das S-Protein von DHBV eine eigentümliche Transmembrantopologie beschreiben. Demnach soll ein Teil der ersten hydrophilen Schleife zwischen TM1 und TM2 (Aminosäuren 207-226) auf der Oberfläche von subviralen Partikeln lokalisiert sein, was zwischen TM1 und TM2 zwei weitere Transmembrandurchgänge der S-Proteinsequenz zur Folge hat (Grgacic *et al.*, 2000; Grgacic und Schaller, 2000). Weiterhin wird die Bedeutung der Proteinstruktur und die diesbezügliche Existenz wesentlicher Unterschiede zwischen den HBV- und DHBV-Hüllproteinen durch den Befund unterstützt, daß DHBV-Hüllproteine (im Gegensatz zu WHBV-Hüllproteinen) mit HBV-Hüllproteinen keine gemischten subviralen Partikel ausbilden können (Gerhardt und Bruss, 1995). Trotz dieser strukturellen Unterschiede des HBV und DHBV L-Proteins bilden beide letztlich eine partielle duale präS-Topologie aus und sind damit in der Lage, multiple Funktion durchzuführen. Da diese außergewöhnliche Membrantopologie innerhalb der Hepadnaviren konserviert ist und offensichtlich durch einen komplexen Translokationsmechanismus herbeigeführt wird, liegt es letztlich jedoch nahe anzunehmen, daß wenigstens der Grundmechanismus der posttranslationalen präS-Translokation bei HBV und DHBV vergleichbar ist.

Der C-terminale Bereich der präS₂-Region, der als zellpermeables Peptid-Motiv (TLM) beschrieben wurde (Oess und Hildt, 2000), spielt bei der posttranslationalen präS-Translokation keine Rolle. Obwohl für dieses Translokationsmotiv gezeigt wurde, daß es in der Lage ist, als Fusionspeptid selbst komplex gefaltete Proteine, wie z.B. GFP, durch die Plasmamembran zu translozieren (Oess und Hildt, 2000), hat es keinen Einfluß auf die Proteintranslokation durch die ER-Membran. Neben dem hier erzielten Befund, daß dieses Motiv deletiert werden kann, ohne die posttranslationale präS-Translokation zu beeinträchtigen, konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, daß dieses Motiv für die Virusmorphogenese und die Infektion von HBV entbehrlich ist (Bruss und Vieluf, 1995; Le Seyec *et al.*, 1998; Le Seyec *et al.*, 1999). Sowohl die Morphogenese als auch die Infektion sind von der dualen Topologie des L-Proteins abhängig. Weiterhin spricht auch die Unfähigkeit der Mutante L Δ TM_{2/3/4}, eine Translokation der präS-Domäne durchzuführen, gegen eine Bedeutung des TLM-Motivs bei der posttranslationalen präS-Translokation von L.

Da eine HBV-spezifische Transmembranpore wahrscheinlich keine Rolle bei der posttranslationalen präS-Translokation spielt, stellte sich die Frage nach einem alternativen Mechanismus. Auf der Suche danach wurde zunächst versucht, den intrazellulären Ort der präS-Reorientierung zu bestimmen. Aufgrund der fehlenden N-Glykosylierung innerhalb der präS-Domäne wurde bisher angenommen, daß die präS-Translokation in einem post-ER-Kompartiment stattfindet (Prange und Streeck, 1995). Für diese Annahme fehlten jedoch weitere experimentelle Hinweise. Da auch der intrazelluläre Ort der Umhüllung von HBV-Nukleokapsiden („Virus-budding“) zur Zeit nicht bekannt ist, wurden alle wichtigen Kompartimente des sekretorischen Weges hinsichtlich ihrer Bedeutung bei der präS-Reorientierung untersucht. Die hier durchgeführten Versuche konnten deutlich sowohl den Golgi-Komplex als auch das Intermediäre Kompartiment als Ort der posttranslationalen präS-Translokation des L-Proteins ausschließen. Vielmehr zeigte sich, daß die präS-Reorientierung innerhalb des ER stattfindet. Dieser Befund wies nun auf eine völlig neue Hypothese, welche die posttranslationale präS-Translokation des L-Proteins erklären könnte. Sie beinhaltet, daß die präS-Region möglicherweise mit Hilfe des Translokons (Sec61-Komplex) im ER der Wirtszelle transloziert wird. Zunächst gibt es eine empirische Überlegung, die diese Hypothese stützt. Sie lautet: Viren sind Meister in der Ausnutzung wirtseigener Strukturen für ihre eigenen Zwecke. Nachfolgend sollen die experimentellen Daten diskutiert werden, die für diese Hypothese sprechen.

Wichtig ist der Befund, daß ein Teil des L-Proteins auch nach der Translation nicht in die Lipidschicht eingebaut ist, sondern sich für längere Zeit in einer Proteinumgebung befindet oder mit dieser reassoziert. Bei dieser Proteinumgebung könnte es sich tatsächlich um das Translokons handeln, da es schon für andere Proteine gezeigt wurde, daß sich Transmembranproteine vor ihrer Integration in die Lipidschicht für längere Zeit innerhalb des Sec61-Komplexes aufhalten und sich auch mehrere Moleküle im Translokons selbst oder in Assoziation mit diesem befinden können (Borel und Simon, 1996; Mothes *et al.*, 1997). Dies ist auch in Übereinstimmung mit dem inneren Durchmesser dieser Pore, der zwischen 15 und 60 Å variieren kann (Hamman *et al.*, 1997; Hamman *et al.*, 1998). Es scheint also möglich, daß das L-Protein nach seiner Synthese mit dem Translokons assoziiert bleibt - oder mit diesem reassoziert - und erst in diesem Zustand eine posttranslationale Translokation der präS-Region erfolgt. Für die Assoziation des L-Proteins mit einer oder mehrerer Komponenten des Translokons ist möglicherweise das Leucinreißverschluß-Motiv von TM2 essentiell.

Im allgemeinen ist die posttranslationale Proteintranslokation in das ER-Lumen durch folgende Merkmale definiert: 1) Sie erfolgt unabhängig vom Signal-Erkennungspartikel (SRP = signal recognition particle) und 2) nach Beendigung der Translation, das heißt unabhängig vom Ribosom. Entdeckt wurde dieser Mechanismus bei unterschiedlichen Proteinen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* unter Verwendung eines *In vitro*-Systems (Hansen *et al.*, 1986; Waters und Blobel, 1986; Hansen und Walter, 1988). In Hefezellen konnte auch *in vivo* eine posttranslationale Translokation nachgewiesen werden (Rothblatt *et al.*, 1989). Dagegen gibt es in Säugerzellen nur unzureichende Hinweise für diesen alternativen Translokationsmechanismus (Klappa *et al.*, 1991; Schlenstedt *et al.*, 1992; Klappa *et al.*, 1994). Die einzigen natürlichen Substrate, von denen bisher bekannt ist, daß sie in das ER-Lumen von Säugerzellen nach der Beendigung ihrer Synthese translozieren können, sind kurze Vorläufer-Membranproteine (Watts *et al.*, 1983) oder kurze Vorläufer von hydrophoben, sekretorischen Proteinen (Zimmermann und Mollay, 1986). Die Charakterisierung der posttranslationalen Proteintranslokation erfolgte bisher ausschließlich in Hefezellen. Ein entscheidender Schritt dabei war die Rekonstitution der posttranslationalen Translokation des Prepro- α -Faktors in einem *In vitro*-System (Panzner *et al.*, 1995). Zur vollen Rekonstitution waren neben dem tetrameren Sec61-Komplex (Sec61 α , Sec61 β , Sec61 γ) auch der Sec62-Sec63-Komplex (Sec62p, Sec63p, Sec71p, Sec72p) sowie das luminaire Chaperon Kar2p (BiP) notwendig. Neuere Studien wiesen jedoch darauf hin, daß auch in Säugerzellen eine posttranslationale Proteintranslokation möglich sein könnte. Es wurden Proteine innerhalb der ER-Membran identifiziert, die eine strukturelle Homologie zu Sec63p und Sec62p aufweisen und mit dem Sec61-Komplex assoziiert sind (Skowronek *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2000). Weiterhin zeigte sich, daß beide Proteine auch in Hundepankreas-Mikrosomen zu finden sind und dort in etwa gleicher Konzentration wie das Sec61 α -Protein vorkommen (Tyedmers *et al.*, 2000). Zusätzlich konnte auch die funktionelle Interaktion von BiP mit der J-Domäne von Sec63 im mikrosomalen Lumen nachgewiesen werden. Im Hefesystem zeigte sich, daß weder der Sec61-Komplex noch der Sec62-Sec63-Komplex allein eine Translokation des Prepro- α -Faktors herbeiführen können (Panzner *et al.*, 1995). Gleichzeitig wies dieses System die ATP-Abhängigkeit des posttranslationalen Transports nach (Hansen *et al.*, 1986; Waters und Blobel, 1986; Panzner *et al.*, 1995). ATP ist ein wichtiger Kofaktor für die Regulation der Funktion intrazellulärer Chaperone (Bukau und Horwich, 1998; Zimmermann, 1998) und beeinflußt daher auch das BiP-Protein. Wird die Funktion von BiP durch nichthydrolysierbares ATP beeinträchtigt, so findet keine posttranslationale Proteintranslokation statt. Gleichzeitig benötigt BiP die funktionelle

Interaktion mit der luminalen J-Domäne des Sec63-Proteins (Brodsky und Schekman, 1993; Brodsky *et al.*, 1995). Lyman und Schekman (1997) konnten zeigen, daß Sec62p, Sec71p und Sec72p einen Subkomplex des Translokons ausbilden, der als spezifische Bindungsstelle für Proteine mit posttranslationaler Translokation dient (Feldheim *et al.*, 1992). Unter der Anwesenheit von ATP wird das zu translozierende Protein von diesem Subkomplex entlassen und auf den Sec61-Kanal übertragen. Dieser ATP-abhängige Transfermechanismus wird durch die Interaktion zwischen Sec63 und BiP vermittelt (Lyman und Schekman, 1995; Lyman und Schekman, 1997). Und schließlich sind Sec63 und BiP auch an der Vervollständigung der Translokation beteiligt. Sec63p scheint insgesamt eine Schlüsselrolle bei der posttranslationalen Proteintranslokation zu spielen. Seine Topologie - drei Transmembrandomänen, eine große zytosolische Domäne und die luminalen J-Domäne (Feldheim *et al.*, 1992) - ermöglichen es dem Protein offensichtlich, sowohl Signale auf der zytosolischen Seite als auch auf der luminalen Seite aufzunehmen und weiterleiten zu können. Gleichzeitig befindet sich Sec63p in Kontakt mit Sec61p, Sec71p und Sec72p (Deshaies *et al.*, 1991), so daß auch eine laterale Signalweitergabe möglich ist.

Neben dem im ER-Lumen lokalisierten BiP-Chaperon spielen jedoch auch zytosolische Chaperone eine Rolle. So konnte für das konstitutiv-exprimierte, zytosolische Protein Hsc70 gezeigt werden, daß es die zu transportierenden Proteine in einer translokations-kompetenten Struktur bewahrt (Chirico *et al.*, 1988; Deshaies *et al.*, 1988). Proteine mit gefalteten, „reifen“ Domänen sind nicht in der Lage, biologische Membranen zu überqueren (Verner und Schatz, 1988). Die Funktion von Hsc70 im allgemeinen, aber auch während der posttranslationalen Proteintranslokation, wird - vergleichbar zu BiP - sowohl durch die Hydrolyse von ATP als auch durch die spezifische Interaktion mit der J-Domäne eines Kochaperons (Hsp40) reguliert (McClellan *et al.*, 1998). Hefestämme, die ein mutiertes Hsc70- oder Hsp40-Molekül beinhalten, sind nicht in der Lage, eine posttranslationale Proteintranslokation durchzuführen (Deshaies *et al.*, 1988; Caplan *et al.*, 1992).

Die oben dargelegten Erkenntnisse unterstreichen die Relevanz der Befunde dieser Arbeit, daß das HBV L-Protein *in vivo* sowohl mit dem BiP- als auch mit dem Hsc70-Chaperon interagiert. Dies wird zusätzlich durch die Beteiligung des spezifischen Kochaperons Hsp40 am L-Hsc70-Komplex unterstützt. Wie oben dargelegt, konnten *In vitro*-Studien kürzlich zeigen, daß die Bindungsstelle von Hsc70 innerhalb der präS1-Domäne des L-Proteins liegt (Löffler-Mary *et al.*, 1997). Da die gesamte präS-Region von L keine Signalsequenz besitzt (Ostapchuk *et al.*, 1994), ergibt sich für L zunächst folgendes Szenario (Abb. 33): Die Translation des L-Proteins beginnt an freien Ribosomen im Zytoplasma (a). Während der

Synthese der präS-Domäne bindet das zytosolische Chaperon Hsc70 und hält sie in einer translokations-kompetenten Konformation. Nach der Translation der Signalsequenzen innerhalb der S-Region erfolgt die Bindung des SRP und die Assoziation des Ribosoms mit dem Translokon (b). Die S-Domäne des L-Proteins wird nun kotranslational in die ER-Membran integriert, während die präS-Region (und vermutlich auch TM1) - bedingt durch die Bindung von Hsc70 - auf der zytosolischen Seite des ER zurückgehalten wird. Nach der Beendigung der Translation löst sich dann das Ribosom vom Translokon ab und das L-Protein verbleibt zunächst innerhalb der Pore selbst oder in der Proteinumgebung des Sec-Komplexes (c). Sollte jetzt das Translokon die posttranslationale Translokation der präS-Domäne vermitteln, so stellen sich folgende Fragen: Erstens, wie wird das Translokon verschlossen bzw. der Verschluss während der posttranslationalen präS-Translokation reguliert, um die Permeabilitätsbarriere der ER-Membran zu bewahren? Zweitens, gibt es Signale innerhalb der präS-Domäne, die für die Initiation der posttranslationalen Translokation notwendig sind? Drittens, durch welche treibende Kraft wird die präS-Translokation herbeigeführt? Und viertens, warum erfolgt die Translokation nur partiell? Gibt es hierfür möglicherweise Regulationsmechanismen?

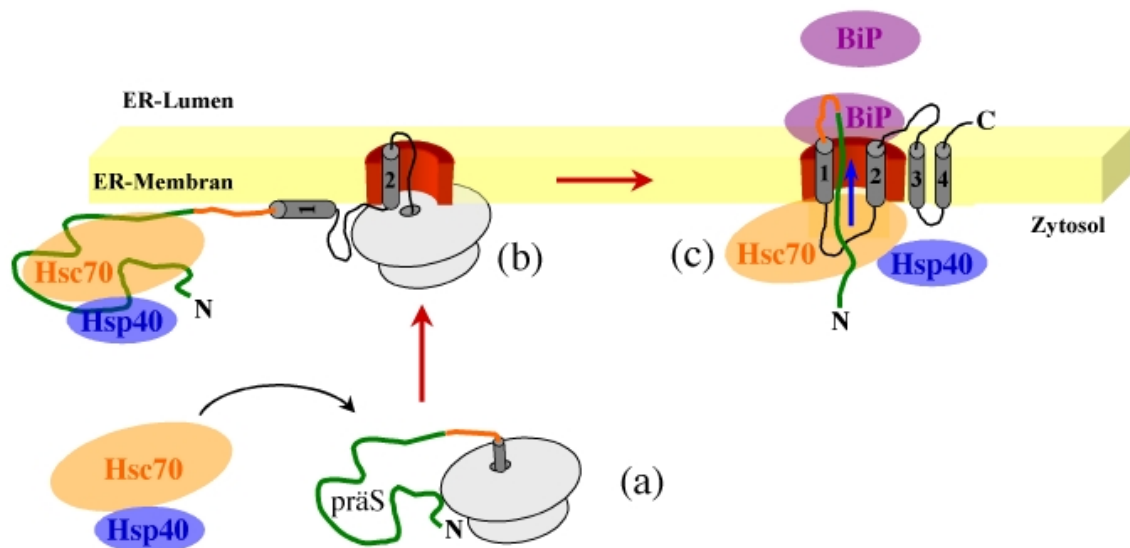


Abb. 33: Modell zur posttranslationalen präS-Translokation mit Hilfe des ER-Translokons.

Die Synthese des L-Proteins beginnt im Zytosol der Zelle an freien Ribosomen. Nach der Translokation der präS-Domäne bindet das zytosolische Chaperon Hsc70, zusammen mit seinem spezifischen Kochaperon Hsp40. Das Erscheinen der ersten Signalsequenz (TM1) innerhalb der S-Region von L führt zur Assoziation des Ribosoms mit dem Translokon an der ER-Membran. (b) Das L-Protein wird nun kotranslational in die ER-Membran eingelagert, verbleibt jedoch zunächst in enger Verbindung mit dem Translokon. Die präS-Region - und wahrscheinlich auch TM1 - bleibt zunächst auch der zytosolischen Seite der ER-Membran lokalisiert. (c) Nach dem Ende der L-Synthese löst sich das Ribosom vom Translokon ab und der Kanal wird mit Hilfe der Chaperone Hsc70 und BiP verschlossen. Schließlich erfolgt posttranslational die Translokation der präS-Domäne durch das Translokon in das ER-Lumen hinein.

Was die Frage nach der Erhaltung der Permeabilitätsbarriere angeht, so konnte bei der kotranslationalen Proteintranslokation gezeigt werden, daß hierbei ebenfalls das BiP-Chaperon eine Rolle spielt (Hamman *et al.*, 1998). Gleichzeitig scheint auch eine „gating“-Funktion von Hsc70 auf der zytosolischen Seite vorstellbar. Um die präS-Translokation nun zu initiieren, ist ein Signal nötig. Der einfachste denkbare Mechanismus besteht darin, daß dieses Signal innerhalb von TM1 liegt. Dies könnte zu einer Reorientierung - d.h. zu einer Drehung um 90° - von TM1 führen, womit gleichzeitig die N-terminale präS-Domäne durch den hydrophilen Kanal des Translokons geschleust würde. Eine ähnliche topologische Reorientierung einer Transmembrandomäne und der benachbarten Proteinbereiche wurde kürzlich bei der Reifung von Aquaporin-1 entdeckt (Lu *et al.*, 2000). Für das L-Protein konnte jedoch bisher noch nicht gezeigt werden, daß TM1 nach der Translation tatsächlich auf der zytosolischen Seite der ER-Membran lokalisiert ist. Gleichzeitig weisen die in dieser Arbeit durchgeführten Mutationsanalysen gegen eine entscheidende Rolle von TM1 bei der

posttranslationalen Translokation von präS. Vielmehr legen die Daten eine essentielle und spezifische Funktion von TM2 bei diesem Prozeß nahe, die weder durch TM1 noch ein anderes hydrophobes Transmembransegment ersetzt werden kann. TM2 scheint folglich auch bei der Initiation der Translokation entscheidend zu sein. Gleichzeitig haben die Analysen der chimären L-Moleküle gezeigt, daß TM2 offensichtlich spezifisch mit der präS-Domäne interagiert, da eine posttranslationale Translokation der verwandten DHBV präS-Region erst nach Koexpression mit dem S-Protein durchgeführt werden kann. Ob die präS-Region jedoch selbst spezifische Signale beinhaltet, oder diese über die Interaktion mit Hsc70 vermittelt, ist offen.

Bei der Frage nach der treibenden Kraft scheint wiederum BiP eine entscheidende Rolle zu spielen. Die derzeitigen Erkenntnisse hierzu stammen sowohl aus dem Hefesystem als auch aus Untersuchungen zum Proteinimport in die Mitochondrien und haben zu zwei unterschiedlichen Modellen geführt. Das eine Modell sieht BiP als reinen Anker, welcher im ER-Lumen ein Zurückgleiten der zu translozierenden Polypeptidkette verhindert (Matlack *et al.*, 1999). Im alternativen Modell wirkt das Chaperon im Lumen als aktiver Motor, der mittels Hydrolyse von ATP und nachfolgender Konformationsänderung die Polypeptidkette durch das Translokon zieht (Voisine *et al.*, 1999). Ob eines der beiden Modelle bei der präS-Translokation eine Rolle spielt, müssen weiterführende Untersuchungen klären. Möglicherweise ist es sinnvoll, in solchen weiterführenden Versuchen den Mechanismus der posttranslationalen präS-Translokation im Hefesystem zu untersuchen, da hier eine Reihe von Hefestämmen zur Verfügung stehen, die Mutationen in beteiligten Proteinen (u.a. auch BiP) aufweisen.

Es bleibt auch die Frage nach dem partiellen Charakter der präS-Translokation. Zunächst könnte ein Erklärungsmodell darin bestehen, daß die duale Topologie des L-Proteins, d.h. die Lokalisation der präS-Domäne sowohl im Zytoplasma als auch im ER-Lumen, einfach die energetisch günstigste Konformation darstellt. Weiterhin sollte auch bedacht werden, daß das L-Protein nach seiner Synthese in den sekretorischen Weg der Zelle eintritt. Es scheint durchaus denkbar, daß die Translokation nur innerhalb spezieller ER-Subdomänen mit spezifischer Proteinausstattung erfolgen kann, und daß das L-Protein ab einem gewissen Zeitpunkt nach seiner Synthese nicht länger in der Lage ist, mit dem Translokon in solchen Subdomänen zu assoziieren. Dies würde bedeuten, Sekretion und Translokation sind konkurrierende Mechanismen, so daß die präS-Translokation in nur etwa 50% der Fälle erfolgen kann. Möglicherweise fehlen solche speziellen ER-Domänen in den Mikrosomen, die aus Hundepankreas gewonnen werden. Dies könnte nämlich erklären, warum die

posttranslationale präS-Translokation im *In vitro*-System mit Hundepankreas-Mikrosomen nicht funktioniert. Erstaunlicherweise wurde auch für das Protein Aquaporin-1 festgestellt, daß eine Reifung in Hundepankreas-Mikrosomen aus bisher nicht geklärten Gründen inhibiert ist (Lu *et al.*, 2000). Unterstützt werden diese Feststellungen möglicherweise durch die *In vitro*-Versuche dieser Arbeit. Die genaue Betrachtung der *In vitro*-Ergebnisse, die unter der Verwendung Digitonin-permeabilisierter Zellen erzielt wurden (Abb. 28 und 29), zeigt nämlich, daß hier möglicherweise doch ein geringer Teil der L-Moleküle eine Translokation ihrer präS-Region durchgeführt hat. Da in diesen Versuchen jedoch permeabilisierte Zellen verwendet wurden, ohne zuvor die interne mRNA abzubauen, entstand ein relativ hohes Hintergrundsignal und es kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden, daß die schwachen Banden, die in der Höhe des L-Proteins laufen, tatsächlich dem L-Protein zuzurechnen sind. Hier sind folglich zusätzliche Versuche notwendig, um möglicherweise auch das *In vitro*-System zur weiteren Aufklärung des Mechanismus der posttranslationalen präS-Translokation nutzen zu können.

Welche Schlußfolgerungen können nun insgesamt gezogen werden? Sicherlich haben die Daten dieser Arbeit nicht zur vollständigen Aufklärung der Mechanismen geführt, welche die präS-Reorientierung des HBV L-Proteins herbeiführen. Sie haben jedoch deutliche Hinweise dafür geliefert, daß die posttranslationale präS-Translokation offensichtlich durch eine spezifische Interaktion des L-Proteins mit einer HBV-unabhängigen Proteinstruktur in der ER-Membran (dem ER-Translokon?) erfolgt. Bei der spezifischen Interaktion mit zellulären Komponenten spielen sowohl die präS-Domäne als auch TM2 eine wichtige Rolle. Das L-Protein scheint folglich ein überaus geeignetes Modellprotein zu sein, um nicht nur HBV-spezifische Fragestellungen, sondern auch grundlegende zelluläre Mechanismen zu studieren.

V. Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung des bis heute ungeklärten Mechanismus der posttranslationalen präS-Translokation beim großen (L) Hüllprotein des Hepatitis-B-Virus (HBV). In der äußeren Hüllmembran von HBV befinden sich drei virale Membranproteine, die in einem einzigen offenen Leserahmen des viralen Genoms kodiert werden. Die HBV-Hüllproteine werden als kleines (S), mittleres (M) und großes (L) Protein bezeichnet. Da sich die Sequenz des S-Proteins sowohl am C-Terminus des M- als auch L-Proteins wiederfindet, stellen sie koterminale Proteine dar. Das M-Protein besitzt gegenüber S eine N-terminale Erweiterung von 55 Aminosäuren (präS2-Region) und das L-Protein gegenüber M eine weitere N-terminale Domäne von 108 Aminosäuren (präS1-Region). PräS1 und präS2 zusammen werden als präS-Domäne des L-Proteins bezeichnet. Die Synthese der HBV-Hüllproteine erfolgt innerhalb der Wirtszelle an den Membranen des rauen Endoplasmatischen Reticulums (ER). Für das S-Protein werden vier Transmembrandomänen (TM) angenommen, und es konnte gezeigt werden, daß die Membranverankerung und die Topologie des Proteins durch die beiden N-terminalen Transmembransegmente TM1 und TM2 bestimmt werden. Auch M- und L-Proteine werden durch die topogenen Signale innerhalb der S-Region in die ER-Membran inseriert. Während jedoch das M-Protein durch kotranslationale präS-Translokation in das ER-Lumen eine einheitliche Topologie ausbildet, findet sich für L eine völlig andere Situation. Das L-Protein bildet eine ungewöhnliche duale Membrantopologie aus. Das bedeutet, in der Virushülle liegen sowohl L-Moleküle vor, bei denen sich die N-terminale präS-Domäne innerhalb des Virus befindet (interne präS-Orientierung = i-präS), als auch solche, die eine externe Orientierung der präS-Region (e-präS) aufweisen. Diese duale Membrantopologie ermöglicht es dem L-Protein multiple Funktionen auszuüben. Während die i-präS-Form z.B. für die Verpackung des viralen Nukleokapsids essentiell ist, vermittelt die e-präS-Form die Invasion von HBV. Die duale Topologie des L-Proteins besitzt somit eine Schlüsselrolle im Lebenszyklus des Virus. Jedoch ist der Mechanismus, der zur Ausbildung der unterschiedlichen L-Topologien führt, bisher weitgehend ungeklärt. Bekannt ist lediglich, daß es sich hierbei um einen außergewöhnlichen Prozeß partieller, posttranslationaler Translokation der präS-Domäne über intrazelluläre Membranen handelt. Das heißt, zum Zeitpunkt der Synthese und Membranintegration von L befindet sich die präS-Region innerhalb des Zytoplasmas. Erst im Laufe der Zeit transloziert etwa die Hälfte der L-Moleküle die präS-Domäne posttranslational über eine intrazelluläre Membran. Ein Modell, das aufgrund von Sequenzanalysen des S-Proteins postuliert wurde,

erklärt diesen Translokationsprozeß mittels einer Transmembranpore, die durch Dimerisierung der amphipathischen Transmembrandomänen TM1, TM3 und TM4 des S-Proteins gebildet werden soll. In der vorliegenden Arbeit wurde nun zunächst dieses Modell experimentell überprüft.

Dazu wurde eine Mutagenese des L-Proteins durchgeführt, um L-spezifische Parameter zu identifizieren, welche die Topologie des Proteins beeinflussen. Eine posttranslationale präS-Translokation, d.h. der Reifungsprozeß der jeweiligen Mutanten, wurde mittels Trypsinschutzversuchen analysiert. Während die i-präS-Form Trypsin-sensitiv ist, findet sich bei der reifen L-Form eine partielle Trypsin-Resistenz. Trypsin-Resistenz ist folglich ein geeigneter Marker für den Prozeß der posttranslationalen präS-Translokation. Entgegen der Annahme einer HBV-spezifischen Translokationspore wurde beobachtet, daß die präS-Reorientierung unabhängig von der Expression des S- und M-Proteins stattfindet. Weiterhin spielt auch die Dimerisierung der Hüllproteine mittels kovalenter Disulfidbrücken keine Rolle bei der Translokation von präS. Entscheidend war jedoch der Befund, daß keine der amphipathischen Transmembrandomänen innerhalb der S-Region des L-Proteins für eine posttranslationale präS-Translokation benötigt wird. Vielmehr zeigte sich, daß TM2 für diesen Prozeß ausreichend und essentiell ist, da es nicht durch ein anderes hydrophobes Transmembransegment ersetzt werden kann. Insgesamt wiesen die Daten folglich gegen das vorgeschlagene Modell eines HBV-spezifischen Transmembrankanals. Es wurde dann eine mögliche Beteiligung des sog. Translokationsmotivs (TLM) getestet. TLM befindet sich am C-Terminus der präS₂-Region und ist in der Lage, eine Translokation der reinen präS-Domäne über die Plasmamembran von Säugerzellen herbeizuführen. Es zeigte sich jedoch, daß TLM keinen Einfluß auf die posttranslationale präS-Reorientierung besitzt. Die Untersuchung der Topologie von chimären HBV-DHBV-L-Proteinen wies vielmehr auf ein spezifisches Zusammenspiel zwischen TM2 und der präS-Region hin.

Um weitere Hinweise über den Mechanismus der posttranslationalen präS-Translokation zu erhalten, wurde der intrazelluläre Ort innerhalb des sekretorischen Weges bestimmt, an dem sich der Prozeß vollzieht. Zunächst konnte durch den Einsatz von Brefeldin A der Golgi-Komplex als Ort der präS-Reorientierung ausgeschlossen werden. Und anschließend konnte mittels subzellulärer Fraktionierungen eindeutig nachgewiesen werden, daß die präS-Translokation schon innerhalb des ER stattfindet. Dieser Befund führte zu der Hypothese einer Beteiligung des wirtseigenen Translokationskanals (Translokon) an der Reorientierung von präS. Dies würde voraussetzen, daß das L-Protein nach seiner Synthese und der Ablösung des Ribosoms für längere Zeit mit dem Translokon assoziiert bleibt oder mit diesem

reassoziiert. Um diese Voraussetzung zu untersuchen, wurde mittels alkalischer Extraktion der Zeitverlauf der Membranintegration von L analysiert. Dabei zeigte sich deutlich, daß sich selbst 30 Minuten nach der Synthese des L-Proteins ein Teil der Moleküle noch in Assoziation mit einer Proteinumgebung befindet und noch nicht vollständig in die ER-Membran integriert ist. Sollte L jedoch unabhängig vom Ribosom mit dem Translokation interagieren können, so stellt sich weiterhin die Frage, wie das Translokation verschlossen wird, so daß die ER-Membran als Permeabilitätsbarriere erhalten bleibt. Bei der posttranslationalen Proteintranslokation in Hefezellen wird diese Aufgabe von zytosolischen und luminalen Chaperonen, wie z.B. Hsc70 und BiP, erfüllt. Folglich wurde die *In vivo*-Interaktion von L mit diesen Chaperonen mittels Koimmunpräzipitationsanalysen untersucht. Sowohl Hsc70 als auch BiP konnten als spezifischer Interaktionspartner von L nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich, daß Hsp40 - ein spezifisches Kochaperon von Hsc70 - am L-Hsc70-Komplex beteiligt ist.

Insgesamt wiesen die Daten dieser Arbeit darauf hin, daß die posttranslationale prä-Translokation des HBV L-Proteins durch einen Transmembrankanale im ER der Wirtszelle vermittelt wird, wobei es sich durchaus um das Translokation handeln könnte. Das L-Protein erscheint somit als geeignetes Modellmolekül, um den grundlegenden Prozeß der posttranslationalen Proteintranslokation in Säugerzellen weiterführend zu untersuchen.

VI. Literaturverzeichnis

- Albin, C., and Robinson, W. S. (1980). Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J Virol* **34**(1), 297-302.
- Arkin, I. T., Adams, P. D., MacKenzie, K. R., Lemmon, M. A., Brunger, A. T., and Engelman, D. M. (1994). Structural organization of the pentameric transmembrane alpha-helices of phospholamban, a cardiac ion channel. *Embo J* **13**(20), 4757-64.
- Arkin, I. T., Rothman, M., Ludlam, C. F., Aimoto, S., Engelman, D. M., Rothschild, K. J., and Smith, S. O. (1995). Structural model of the phospholamban ion channel complex in phospholipid membranes. *J Mol Biol* **248**(4), 824-34.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1994). "Current Protocols In Molecular Biology." (V. B. Chanda, Ed.). 4 vols. John Wiley & Sons.
- Barnaba, V., and Balsano, F. (1992). Immunologic and molecular basis of viral persistence. The hepatitis B virus model. *J Hepatol* **14**(2-3), 391-400.
- Bartenschlager, R., and Schaller, H. (1988). The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *Embo J* **7**(13), 4185-92.
- Bashour, A. M., and Bloom, G. S. (1998). 58K, a microtubule-binding Golgi protein, is a formiminotransferase cyclodeaminase. *J Biol Chem* **273**(31), 19612-7.
- Bechinger, B. (2000). Understanding peptide interactions with the lipid bilayer: a guide to membrane protein engineering. *Curr Opin Chem Biol* **4**(6), 639-44.
- Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G., and Frank, J. (1997). Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science* **278**(5346), 2123-6.
- Berting, A., Hahnen, J., Kroger, M., and Gerlich, W. H. (1995). Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein. *Intervirology* **38**(1-2), 8-15.
- Bertoletti, A., Ferrari, C., Fiaccadori, F., Penna, A., Margolskee, R., Schlicht, H. J., Fowler, P., Guilhot, S., and Chisari, F. V. (1991). HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(23), 10445-9.
- Bhakdi, S., Bayley, H., Valeva, A., Walev, I., Walker, B., Kehoe, M., and Palmer, M. (1996). Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and Escherichia coli hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol* **165**(2), 73-9.
- Birnbaum, F., and Nassal, M. (1990). Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *J Virol* **64**(7), 3319-30.
- Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975a). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* **67**(3), 835-51.
- Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975b). Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* **67**(3), 852-62.
- Bloom, G. S., and Brashear, T. A. (1989). A novel 58-kDa protein associates with the Golgi apparatus and microtubules. *J Biol Chem* **264**(27), 16083-92.
- Borel, A. C., and Simon, S. M. (1996). Biogenesis of polytopic membrane proteins: membrane segments assemble within translocation channels prior to membrane integration. *Cell* **85**(3), 379-89.

- Bottcher, B., Wynne, S. A., and Crowther, R. A. (1997). Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy [see comments]. *Nature* **386**(6620), 88-91.
- Brechot, C., Pourcel, C., Louise, A., Rain, B., and Tiollais, P. (1980). Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature* **286**(5772), 533-5.
- Brodsky, J. L., Goeckeler, J., and Schekman, R. (1995). BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21), 9643-6.
- Brodsky, J. L., and Schekman, R. (1993). A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J Cell Biol* **123**(6 Pt 1), 1355-63.
- Bruss, V. (1997). A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J Virol* **71**(12), 9350-7.
- Bruss, V., and Ganem, D. (1991a). Mutational analysis of hepatitis B surface antigen particle assembly and secretion. *J Virol* **65**(7), 3813-20.
- Bruss, V., and Ganem, D. (1991b). The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(3), 1059-63.
- Bruss, V., Lu, X., Thomssen, R., and Gerlich, W. H. (1994). Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *Embo J* **13**(10), 2273-9.
- Bruss, V., and Thomssen, R. (1994). Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis B virion maturation. *J Virol* **68**(3), 1643-50.
- Bruss, V., and Vieluf, K. (1995). Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. *J Virol* **69**(11), 6652-7.
- Bukau, B., and Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**(3), 351-66.
- Caplan, A. J., Cyr, D. M., and Douglas, M. G. (1992). YDJ1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell* **71**(7), 1143-55.
- Casemann, W. H., Meyer, M., Kekule, A. S., Lauer, U., Hofschneider, P. H., and Koshy, R. (1990). A trans-activator function is generated by integration of hepatitis B virus preS/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(8), 2970-4.
- Cattaneo, R., Will, H., Hernandez, N., and Schaller, H. (1983). Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature* **305**(5932), 336-8.
- Chardin, P., and McCormick, F. (1999). Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell* **97**(2), 153-5.
- Chirico, W. J., Waters, M. G., and Blobel, G. (1988). 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* **332**(6167), 805-10.
- Chisari, F. V., and Ferrari, C. (1995). Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* **13**, 29-60.
- Cordes, F. S., Kukul, A., Forrest, L. R., Arkin, I. T., Sansom, M. S., and Fischer, W. B. (2001). The structure of the HIV-1 Vpu ion channel: modelling and simulation studies. *Biochim Biophys Acta* **1512**(2), 291-8.
- Corsi, A. K., and Schekman, R. (1996). Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **271**(48), 30299-302.
- Courtois, G., Baumhueter, S., and Crabtree, G. R. (1988). Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(21), 7937-41.

- Crowley, K. S., Liao, S., Worrell, V. E., Reinhart, G. D., and Johnson, A. E. (1994). Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* **78**(3), 461-71.
- Crowther, R. A., Kiselev, N. A., Bottcher, B., Berriman, J. A., Borisova, G. P., Ose, V., and Pumpens, P. (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* **77**(6), 943-50.
- Dane, D. S., Cameron, C. H., and Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1**(7649), 695-8.
- Dash, S., Rao, K. V., and Panda, S. K. (1992). Receptor for pre-S1(21-47) component of hepatitis B virus on the liver cell: role in virus cell interaction. *J Med Virol* **37**(2), 116-21.
- De Meyer, S., Gong, Z. J., Suwandhi, W., van Pelt, J., Soumillion, A., and Yap, S. H. (1997). Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes. *J Viral Hepat* **4**(3), 145-53.
- Denzer, A. J., Nabholz, C. E., and Spiess, M. (1995). Transmembrane orientation of signal-anchor proteins is affected by the folding state but not the size of the N-terminal domain. *Embo J* **14**(24), 6311-7.
- Deshaies, R. J., Koch, B. D., Werner-Washburne, M., Craig, E. A., and Schekman, R. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* **332**(6167), 800-5.
- Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Feldheim, D. A., and Schekman, R. (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* **349**(6312), 806-8.
- Do, H., Falcone, D., Lin, J., Andrews, D. W., and Johnson, A. E. (1996). The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process. *Cell* **85**(3), 369-78.
- Dunlop, J., Jones, P. C., and Finbow, M. E. (1995). Membrane insertion and assembly of ductin: a polytopic channel with dual orientations. *Embo J* **14**(15), 3609-16.
- Eble, B. E., Lingappa, V. R., and Ganem, D. (1986). Hepatitis B surface antigen: an unusual secreted protein initially synthesized as a transmembrane polypeptide. *Mol Cell Biol* **6**(5), 1454-63.
- Eble, B. E., Lingappa, V. R., and Ganem, D. (1990). The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. *J Virol* **64**(3), 1414-9.
- Eble, B. E., MacRae, D. R., Lingappa, V. R., and Ganem, D. (1987). Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol Cell Biol* **7**(10), 3591-601.
- Eckhardt, S. G., Milich, D. R., and McLachlan, A. (1991). Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus. *J Virol* **65**(2), 575-82.
- Ellis, R. J. (1997). Molecular chaperones: avoiding the crowd. *Curr Biol* **7**(9), R531-3.
- Ellis, R. J., and Hartl, F. U. (1999). Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr Opin Struct Biol* **9**(1), 102-10.
- Enders, G. H., Ganem, D., and Varmus, H. (1985). Mapping the major transcripts of ground squirrel hepatitis virus: the presumptive template for reverse transcriptase is terminally redundant. *Cell* **42**(1), 297-308.
- Evans, E. A., Gilmore, R., and Blobel, G. (1986). Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(3), 581-5.

- Feldheim, D., Rothblatt, J., and Schekman, R. (1992). Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol Cell Biol* **12**(7), 3288-96.
- Fernholz, D., Galle, P. R., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F., and Will, H. (1993). Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. *Virology* **194**(1), 137-48.
- Foster, W., Helm, A., Turnbull, I., Gulati, H., Yang, B., Verkman, A. S., and Skach, W. R. (2000). Identification of sequence determinants that direct different intracellular folding pathways for aquaporin-1 and aquaporin-4 [In Process Citation]. *J Biol Chem* **275**(44), 34157-65.
- Fujiki, Y., Hubbard, A. L., Fowler, S., and Lazarow, P. B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **93**(1), 97-102.
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., and Charnay, P. (1979). Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. coli. *Nature* **281**(5733), 646-50.
- Galle, P. R., Hagelstein, J., Kommerell, B., Volkmann, M., Schranz, P., and Zentgraf, H. (1994). In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus. *Gastroenterology* **106**(3), 664-73.
- Ganem, D. (1996). Hepadnaviridae: the viruses and their replication. 3 ed. In "Virology" (B. N. Fields, D. M. Knipe, and H. P. M., Eds.), Vol. 2, pp. 2703-2737. 2 vols. Lippincott Raven, Philadelphia.
- Garcia, P. D., Ou, J. H., Rutter, W. J., and Walter, P. (1988). Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *J Cell Biol* **106**(4), 1093-104.
- Gerhardt, E., and Bruss, V. (1995). Phenotypic mixing of rodent but not avian hepadnavirus surface proteins into human hepatitis B virus particles. *J Virol* **69**(2), 1201-8.
- Gerken, G., Paterlini, P., Manns, M., Housset, C., Terre, S., Dienes, H. P., Hess, G., Gerlich, W. H., Berthelot, P., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and et, a. (1991). Assay of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction and its relationship to pre-S- and S-encoded viral surface antigens. *Hepatology* **13**(1), 158-66.
- Gerlich, W. H., and Robinson, W. S. (1980). Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* **21**(3), 801-9.
- Gerner, P. R., Friedt, M., Oettinger, R., Lausch, E., and Wirth, S. (1998). The hepatitis B virus seroconversion to anti-HBe is frequently associated with HBV genotype changes and selection of preS2-defective particles in chronically infected children. *Virology* **245**(1), 163-72.
- Glabe, C. G., Hanover, J. A., and Lennarz, W. J. (1980). Glycosylation of ovalbumin nascent chains. The spatial relationship between translation and glycosylation. *J Biol Chem* **255**(19), 9236-42.
- Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S., and Rapoport, T. A. (1992a). A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature* **357**(6373), 47-52.
- Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K. U., and Rapoport, T. A. (1992b). A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* **71**(3), 489-503.
- Görlich, D., and Rapoport, T. A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane [see comments]. *Cell* **75**(4), 615-30.

- Greenfield, J. J., and High, S. (1999). The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Sci* **112**(Pt 10), 1477-86.
- Grgacic, E. V., Kuhn, C., and Schaller, H. (2000). Hepadnavirus envelope topology: insertion of a loop region in the membrane and role of S in L protein translocation. *J Virol* **74**(5), 2455-8.
- Grgacic, E. V., and Schaller, H. (2000). A metastable form of the large envelope protein of duck hepatitis B virus: low-pH release results in a transition to a hydrophobic, potentially fusogenic conformation. *J Virol* **74**(11), 5116-22.
- Gripon, P., Diot, C., and Guguen-Guillouzo, C. (1993). Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration. *Virology* **192**(2), 534-40.
- Gripon, P., Rumin, S., Glaise, D., Guyomard, C., Lucas, J., Cannie, I., Leseyec, J., Trepo, C., and Guguen-Guillouzo, C. (2001). Successful HBV infection of a new highly differentiated human hepatoma cell line. *unpublished data*.
- Gruss, O. J., Feick, P., Frank, R., and Dobberstein, B. (1999). Phosphorylation of components of the ER translocation site. *Eur J Biochem* **260**(3), 785-93.
- Guidotti, L. G., and Chisari, F. V. (2001). Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* **19**, 65-91.
- Guo, J. T., and Pugh, J. C. (1997). Topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus suggests a mechanism for membrane translocation during particle morphogenesis. *J Virol* **71**(2), 1107-14.
- Gurezka, R., Laage, R., Brosig, B., and Langosch, D. (1999). A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments. *J Biol Chem* **274**(14), 9265-70.
- Hamman, B. D., Chen, J. C., Johnson, E. E., and Johnson, A. E. (1997). The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* **89**(4), 535-44.
- Hamman, B. D., Hendershot, L. M., and Johnson, A. E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the lumenal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* **92**(6), 747-58.
- Hanein, D., Matlack, K. E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K. U., Miller, K. R., Rapoport, T. A., and Akey, C. W. (1996). Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* **87**(4), 721-32.
- Hansen, W., Garcia, P. D., and Walter, P. (1986). In vitro protein translocation across the yeast endoplasmic reticulum: ATP-dependent posttranslational translocation of the prepro-alpha-factor. *Cell* **45**(3), 397-406.
- Hansen, W., and Walter, P. (1988). Prepro-carboxypeptidase Y and a truncated form of pre-invertase, but not full-length pre-invertase, can be posttranslationally translocated across microsomal vesicle membranes from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **106**(4), 1075-81.
- Hartmann, E., Gorlich, D., Kostka, S., Otto, A., Kraft, R., Knespel, S., Burger, E., Rapoport, T. A., and Prehn, S. (1993). A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Eur J Biochem* **214**(2), 375-81.
- Heermann, K. H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H., and Gerlich, W. H. (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J Virol* **52**(2), 396-402.
- High, S., and Dobberstein, B. (1992). Mechanisms that determine the transmembrane disposition of proteins. *Curr Opin Cell Biol* **4**(4), 581-6.
- High, S., Martoglio, B., Gorlich, D., Andersen, S. S., Ashford, A. J., Giner, A., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T. A., Dobberstein, B., and et al. (1993). Site-specific photocross-

- linking reveals that Sec61p and TRAM contact different regions of a membrane-inserted signal sequence. *J Biol Chem* **268**(35), 26745-51.
- Hildt, E., Saher, G., Bruss, V., and Hofschneider, P. H. (1996). The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* **225**(1), 235-9.
- Hildt, E., Urban, S., and Hofschneider, P. H. (1995). Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcriptional activator and identification of a minimal MHBst activator. *Oncogene* **11**(10), 2055-66.
- Holsinger, L. J., and Lamb, R. A. (1991). Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* **183**(1), 32-43.
- Hu, J., and Seeger, C. (1996). Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3), 1060-4.
- Hu, J., Toft, D. O., and Seeger, C. (1997). Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *Embo J* **16**(1), 59-68.
- Huovila, A. P., Eder, A. M., and Fuller, S. D. (1992). Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* **118**(6), 1305-20.
- Israel, N., Chenciner, N., Houlmann, C., and Streeck, R. E. (1989). An expression vector for high-level protein synthesis in Vero cells. *Gene* **81**(2), 369-72.
- Johnson, A. E., and van Waes, M. A. (1999). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 799-842.
- Junker-Niepmann, M., Bartenschlager, R., and Schaller, H. (1990). A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *Embo J* **9**(10), 3389-96.
- Kamimura, T., Yoshikawa, A., Ichida, F., and Sasaki, H. (1981). Electron microscopic studies of Dane particles in hepatocytes with special reference to intracellular development of Dane particles and their relation with HBeAg in serum. *Hepatology* **1**(5), 392-7.
- Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W. H., and Helenius, A. (1999). Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **145**(1), 45-55.
- Kau, J. H., and Ting, L. P. (1998). Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J Virol* **72**(5), 3796-803.
- Kim, H. S., Ryu, C. J., and Hong, H. J. (1997). Hepatitis B virus preS1 functions as a transcriptional activation domain. *J Gen Virol* **78**(Pt 5), 1083-6.
- Klappa, P., Mayinger, P., Pipkorn, R., Zimmermann, M., and Zimmermann, R. (1991). A microsomal protein is involved in ATP-dependent transport of presecretory proteins into mammalian microsomes. *Embo J* **10**(10), 2795-803.
- Klappa, P., Zimmermann, M., and Zimmermann, R. (1994). The membrane proteins TRAMP and sec61 alpha p may be involved in post-translational transport of presecretory proteins into mammalian microsomes. *FEBS Lett* **341**(2-3), 281-7.
- Knight, B. C., and High, S. (1998). Membrane integration of Sec61alpha: a core component of the endoplasmic reticulum translocation complex. *Biochem J* **331**(Pt 1), 161-7.
- Kock, J., and Schlicht, H. J. (1993). Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J Virol* **67**(8), 4867-74.
- Koshy, R., Koch, S., von Loringhoven, A. F., Kahmann, R., Murray, K., and Hofschneider, P. H. (1983). Integration of hepatitis B virus DNA: evidence for integration in the single-stranded gap. *Cell* **34**(1), 215-23.
- Kovacs, R. J., Nelson, M. T., Simmerman, H. K., and Jones, L. R. (1988). Phospholamban forms Ca²⁺-selective channels in lipid bilayers. *J Biol Chem* **263**(34), 18364-8.
- Krieg, U. C., Johnson, A. E., and Walter, P. (1989). Protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane: identification by photocross-linking of a 39-kD

- integral membrane glycoprotein as part of a putative translocation tunnel. *J Cell Biol* **109**(5), 2033-43.
- Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* **157**(1), 105-32.
- Lambert, C., and Prange, R. (2001). Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation. *J Biol Chem* **276**(25), 22265-72.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F., and McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**(4860), 1759-64.
- Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C., and Gripon, P. (1998). Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity. *J Virol* **72**(7), 5573-8.
- Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C., and Gripon, P. (1999). Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol* **73**(3), 2052-7.
- Levy, D. (1996). Membrane proteins which exhibit multiple topological orientations. *Essays Biochem* **31**, 49-60.
- Liao, S., Lin, J., Do, H., and Johnson, A. E. (1997). Both luminal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. *Cell* **90**(1), 31-41.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L. C., Bonifacino, J. S., and Klausner, R. D. (1989). Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* **56**(5), 801-13.
- Lo, W. Y., and Ting, L. P. (1994). Repression of enhancer II activity by a negative regulatory element in the hepatitis B virus genome. *J Virol* **68**(3), 1758-64.
- Locker, J. K., Rose, J. K., Horzinek, M. C., and Rottier, P. J. (1992). Membrane assembly of the triple-spanning coronavirus M protein. Individual transmembrane domains show preferred orientation. *J Biol Chem* **267**(30), 21911-8.
- Löffler-Mary, H., Dumortier, J., Klentsch-Zimmer, C., and Prange, R. (2000). Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins. *Virology* **270**(2), 358-67.
- Löffler-Mary, H., Werr, M., and Prange, R. (1997). Sequence-specific repression of cotranslational translocation of the hepatitis B virus envelope proteins coincides with binding of heat shock protein Hsc70. *Virology* **235**(1), 144-52.
- Lopez-Cabrera, M., Letovsky, J., Hu, K. Q., and Siddiqui, A. (1990). Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter: trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(13), 5069-73.
- Lu, Y., Turnbull, I. R., Bragin, A., Carveth, K., Verkman, A. S., and Skach, W. R. (2000). Reorientation of aquaporin-1 topology during maturation in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **11**(9), 2973-85.
- Lyman, S. K., and Schekman, R. (1995). Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **131**(5), 1163-71.
- Lyman, S. K., and Schekman, R. (1997). Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell* **88**(1), 85-96.
- Machida, A., Ohnuma, H., Tsuda, F., Yoshikawa, A., Hoshi, Y., Tanaka, T., Kishimoto, S., Akahane, Y., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1991). Phosphorylation in the carboxyl-terminal domain of the capsid protein of hepatitis B virus: evaluation with a monoclonal antibody. *J Virol* **65**(11), 6024-30.

- Mandart, E., Kay, A., and Galibert, F. (1984). Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences. *J Virol* **49**(3), 782-92.
- Mangold, C. M., and Streeck, R. E. (1993). Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *J Virol* **67**(8), 4588-97.
- Mangold, C. M., Unckell, F., Werr, M., and Streeck, R. E. (1997). Analysis of intermolecular disulfide bonds and free sulfhydryl groups in hepatitis B surface antigen particles. *Arch Virol* **142**(11), 2257-67.
- Marassi, F. M., Ma, C., Gratkowski, H., Straus, S. K., Strebel, K., Oblatt-Montal, M., Montal, M., and Opella, S. J. (1999). Correlation of the structural and functional domains in the membrane protein Vpu from HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25), 14336-41.
- Marion, P. L., Oshiro, L. S., Regnery, D. C., Scullard, G. H., and Robinson, W. S. (1980). A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(5), 2941-5.
- Martoglio, B., Hofmann, M. W., Brunner, J., and Dobberstein, B. (1995). The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell* **81**(2), 207-14.
- Mason, W. S., Seal, G., and Summers, J. (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* **36**(3), 829-36.
- Matlack, K. E., Misselwitz, B., Plath, K., and Rapoport, T. A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* **97**(5), 553-64.
- Matlack, K. E., Mothes, W., and Rapoport, T. A. (1998). Protein translocation: tunnel vision. *Cell* **92**(3), 381-90.
- Matlack, K. E., Plath, K., Misselwitz, B., and Rapoport, T. A. (1997). Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science* **277**(5328), 938-41.
- McAller, W. J., Buynak, E. B., Maigetter, R. Z., Wampler, D. E., Miller, W. J., and Hilleman, M. R. (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant genes. *Nature* **307**, 178-180.
- McClellan, A. J., Endres, J. B., Vogel, J. P., Palazzi, D., Rose, M. D., and Brodsky, J. L. (1998). Specific molecular chaperone interactions and an ATP-dependent conformational change are required during posttranslational protein translocation into the yeast ER. *Mol Biol Cell* **9**(12), 3533-45.
- Meyer, H. A., Grau, H., Kraft, R., Kostka, S., Prehn, S., Kalies, K. U., and Hartmann, E. (2000). Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J Biol Chem* **275**(19), 14550-7.
- Mondelli, M., Vergani, G. M., Alberti, A., Vergani, D., Portmann, B., Eddleston, A. L., and Williams, R. (1982). Specificity of T lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection: evidence that T cells are directed against HBV core antigen expressed on hepatocytes. *J Immunol* **129**(6), 2773-8.
- Mothes, W., Heinrich, S. U., Graf, R., Nilsson, I., von Heijne, G., Brunner, J., and Rapoport, T. A. (1997). Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* **89**(4), 523-33.
- Mothes, W., Prehn, S., and Rapoport, T. A. (1994). Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *Embo J* **13**(17), 3973-82.
- Nassal, M. (1999). Hepatitis B Virus Replication: Novel Roles for Virus-Host Interactions. *Intervirology* **42**, 100-116.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* **1**(7), 841-5.

- Neurath, A. R., Kent, S. B., Strick, N., and Parker, K. (1986). Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* **46**(3), 429-36.
- Neurath, A. R., Strick, N., and Sproul, P. (1992). Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein. *J Exp Med* **175**(2), 461-9.
- Newbold, J. E., Xin, H., Tencza, M., Sherman, G., Dean, J., Bowden, S., and Locarnini, S. (1995). The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol* **69**(6), 3350-7.
- Nilsson, I. M., and von Heijne, G. (1993). Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **268**(8), 5798-801.
- Ochiya, T., Tsurimoto, T., Ueda, K., Okubo, K., Shiozawa, M., and Matsubara, K. (1989). An in vitro system for infection with hepatitis B virus that uses primary human fetal hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(6), 1875-9.
- Oess, S., and Hildt, E. (2000). Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene Ther* **7**(9), 750-8.
- Ostapchuk, P., Hearing, P., and Ganem, D. (1994). A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *Embo J* **13**(5), 1048-57.
- Ou, J. H., Laub, O., and Rutter, W. J. (1986). Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(6), 1578-82.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., and Rapoport, T. A. (1995). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* **81**(4), 561-70.
- Patzer, E. J., Nakamura, G. R., and Yaffe, A. (1984). Intracellular transport and secretion of hepatitis B surface antigen in mammalian cells. *J Virol* **51**(2), 346-53.
- Pelham, H. R., and Jackson, R. J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* **67**(1), 247-56.
- Persing, D. H., Varmus, H. E., and Ganem, D. (1987). The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid. *J Virol* **61**(5), 1672-7.
- Petit, M. A., Dubanchet, S., Capel, F., Voet, P., Dauguet, C., and Hauser, P. (1991). HepG2 cell binding activities of different hepatitis B virus isolates: inhibitory effect of anti-HBs and anti-preS1(21-47). *Virology* **180**(2), 483-91.
- Petit, M. A., Capel, F., Dubanchet, S., and Mabit, H. (1992). PreS1-specific binding proteins as potential receptors for hepatitis B virus in human hepatocytes. *Virology* **187**(1), 211-22.
- Poisson, F., Severac, A., Hourieux, C., Goudeau, A., and Roingeard, P. (1997). Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle. *Virology* **228**(1), 115-20.
- Pollard, K. M., Chan, E. K., Grant, B. J., Sullivan, K. F., Tan, E. M., and Glass, C. A. (1990). In vitro posttranslational modification of lamin B cloned from a human T-cell line. *Mol Cell Biol* **10**(5), 2164-75.
- Pontisso, P., Ruvoletto, M. G., Gerlich, W. H., Heermann, K. H., Bardini, R., and Alberti, A. (1989). Identification of an attachment site for human liver plasma membranes on hepatitis B virus particles. *Virology* **173**(2), 522-30.
- Pontisso, P., Ruvoletto, M. G., Tiribelli, C., Gerlich, W. H., Ruol, A., and Alberti, A. (1992). The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross-react in their binding to the hepatocyte surface. *J Gen Virol* **73**(Pt 8), 2041-5.
- Prange, R., Clemen, A., and Streeck, R. E. (1991). Myristylation is involved in intracellular retention of hepatitis B virus envelope proteins. *J Virol* **65**(7), 3919-23.

- Prange, R., Nagel, R., and Streeck, R. E. (1992). Deletions in the hepatitis B virus small envelope protein: effect on assembly and secretion of surface antigen particles. *J Virol* **66**(10), 5832-41.
- Prange, R., and Streeck, R. E. (1995). Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *Embo J* **14**(2), 247-56.
- Presley, J. F., Cole, N. B., Schroer, T. A., Hirschberg, K., Zaal, K. J., and Lippincott-Schwartz, J. (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells [see comments]. *Nature* **389**(6646), 81-5.
- Qiao, M., Macnaughton, T. B., and Gowans, E. J. (1994). Adsorption and penetration of hepatitis B virus in a nonpermissive cell line. *Virology* **201**(2), 356-63.
- Radziwill, G., Tucker, W., and Schaller, H. (1990). Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol* **64**(2), 613-20.
- Rapoport, T. A., Jungnickel, B., and Kutay, U. (1996). Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem* **65**, 271-303.
- Reiss, G., te Heesen, S., Gilmore, R., Zufferey, R., and Aebi, M. (1997). A specific screen for oligosaccharyltransferase mutations identifies the 9 kDa OST5 protein required for optimal activity in vivo and in vitro. *Embo J* **16**(6), 1164-72.
- Robinson, W. S. (1977). The genome of hepatitis B virus. *Annu Rev Microbiol* **31**, 357-77.
- Roingard, P., Lu, S. L., Sureau, C., Freschlin, M., Arbeille, B., Essex, M., and Romet-Lemonne, J. L. (1990). Immunocytochemical and electron microscopic study of hepatitis B virus antigen and complete particle production in hepatitis B virus DNA transfected HepG2 cells. *Hepatology* **11**(2), 277-85.
- Roossinck, M. J., Jameel, S., Loukin, S. H., and Siddiqui, A. (1986). Expression of hepatitis B viral core region in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **6**(5), 1393-400.
- Rothblatt, J. A., Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Daum, G., and Schekman, R. (1989). Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J Cell Biol* **109**(6 Pt 1), 2641-52.
- Rothman, J. E., and Lodish, H. F. (1977). Synchronised transmembrane insertion and glycosylation of a nascent membrane protein. *Nature* **269**(5631), 775-80.
- Sadler, I., Chiang, A., Kurihara, T., Rothblatt, J., Way, J., and Silver, P. (1989). A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an Escherichia coli heat shock protein. *J Cell Biol* **109**(6 Pt 1), 2665-75.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning, A Laboratory Manual." Second Edition ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12), 5463-7.
- Sansom, M. S., Kerr, I. D., Smith, G. R., and Son, H. S. (1997). The influenza A virus M2 channel: a molecular modeling and simulation study. *Virology* **233**(1), 163-73.
- Santantonio, T., Jung, M. C., Schneider, R., Fernholz, D., Milella, M., Monno, L., Pastore, G., Pape, G. R., and Will, H. (1992). Hepatitis B virus genomes that cannot synthesize pre-S2 proteins occur frequently and as dominant virus populations in chronic carriers in Italy. *Virology* **188**(2), 948-52.
- Schaller, H., and Fischer, M. (1991). Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* **168**, 21-39.
- Schlenstedt, G., Gudmundsson, G. H., Boman, H. G., and Zimmermann, R. (1992). Structural requirements for transport of preprocecropinA and related presecretory proteins into mammalian microsomes. *J Biol Chem* **267**(34), 24328-32.
- Seeger, C., Ganem, D., and Varmus, H. E. (1986). Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* **232**(4749), 477-84.

- Seifer, M., Zhou, S., and Standing, D. N. (1993). A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in *Xenopus* oocytes. *J Virol* **67**(1), 249-57.
- Shaul, Y., Rutter, W. J., and Laub, O. (1985). A human hepatitis B viral enhancer element. *Embo J* **4**(2), 427-30.
- Simmerman, H. K., Kobayashi, Y. M., Autry, J. M., and Jones, L. R. (1996). A leucine zipper stabilizes the pentameric membrane domain of phospholamban and forms a coiled-coil pore structure. *J Biol Chem* **271**(10), 5941-6.
- Simon, S. M., and Blobel, G. (1991). A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* **65**(3), 371-80.
- Skowronek, M. H., Rotter, M., and Haas, I. G. (1999). Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. *Biol Chem* **380**(9), 1133-8.
- Spiess, M. (1995). Heads or tails--what determines the orientation of proteins in the membrane. *FEBS Lett* **369**(1), 76-9.
- Sprengel, R., Kaleta, E. F., and Will, H. (1988). Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* **62**(10), 3832-9.
- Stirk, H. J., Thornton, J. M., and Howard, C. R. (1992). A topological model for hepatitis B surface antigen. *Intervirology* **33**(3), 148-58.
- Summers, J., and Mason, W. S. (1982). Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* **29**(2), 403-15.
- Summers, J., Smith, P. M., and Horwich, A. L. (1990). Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol* **64**(6), 2819-24.
- Summers, J., Smolec, J. M., and Snyder, R. (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(9), 4533-7.
- Sureau, C., Romet-Lemonne, J. L., Mullins, J. I., and Essex, M. (1986). Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* **47**(1), 37-47.
- Swameye, I., and Schaller, H. (1997). Dual topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus: determinants preventing pre-S translocation and glycosylation. *J Virol* **71**(12), 9434-41.
- Tiollais, P., Pourcel, C., and Dejean, A. (1985). The hepatitis B virus. *Nature* **317**(6037), 489-95.
- Tisdale, E. J., and Balch, W. E. (1996). Rab2 is essential for the maturation of pre-Golgi intermediates. *J Biol Chem* **271**(46), 29372-9.
- Tisdale, E. J., Bourne, J. R., Khosravi-Far, R., Der, C. J., and Balch, W. E. (1992). GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J Cell Biol* **119**(4), 749-61.
- Toh, H., Hayashida, H., and Miyata, T. (1983). Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. *Nature* **305**(5937), 827-9.
- Torres, J., Adams, P. D., and Arkin, I. T. (2000). Use of a new label, (13)C===(18)O, in the determination of a structural model of phospholamban in a lipid bilayer. Spatial restraints resolve the ambiguity arising from interpretations of mutagenesis data. *J Mol Biol* **300**(4), 677-85.
- Treichel, U., Meyer zum Buschenfelde, K. H., Stockert, R. J., Poralla, T., and Gerken, G. (1994). The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers. *J Gen Virol* **75**(Pt 11), 3021-9.

- Tur-Kaspa, R., Burk, R. D., Shaul, Y., and Shafritz, D. A. (1986). Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(6), 1627-31.
- Tuttleman, J. S., Pourcel, C., and Summers, J. (1986). Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* **47**(3), 451-60.
- Tyedmers, J., Lerner, M., Bies, C., Dudek, J., Skowronek, M. H., Haas, I. G., Heim, N., Nastainczyk, W., Volkmer, J., and Zimmermann, R. (2000). Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(13), 7214-9.
- Ueda, K., Tsurimoto, T., and Matsubara, K. (1991). Three envelope proteins of hepatitis B virus: large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles. *J Virol* **65**(7), 3521-9.
- Verner, K., and Schatz, G. (1988). Protein translocation across membranes. *Science* **241**(4871), 1307-13.
- Voisine, C., Craig, E. A., Zufall, N., von Ahsen, O., Pfanner, N., and Voos, W. (1999). The protein import motor of mitochondria: unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell* **97**(5), 565-74.
- von Heijne, G. (1989). Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* **341**, 456-8.
- von Heijne, G. (1994). Membrane proteins: from sequence to structure. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **23**, 167-92.
- Walter, P., and Blobel, G. (1983). Disassembly and reconstitution of signal recognition particle. *Cell* **34**(2), 525-33.
- Walter, P., and Lingappa, V. R. (1986). Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* **2**, 499-516.
- Walter, P., and Johnson, A. E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 87-119.
- Wang, G. H., and Seeger, C. (1992). The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* **71**(4), 663-70.
- Wang, L., and Dobberstein, B. (1999). Oligomeric complexes involved in translocation of proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **457**(3), 316-22.
- Waters, M. G., and Blobel, G. (1986). Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur posttranslationally and requires ATP hydrolysis. *J Cell Biol* **102**(5), 1543-50.
- Watts, C., Wickner, W., and Zimmermann, R. (1983). M13 procoat and a pre-immunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(10), 2809-13.
- Weber, M., Bronsema, V., Bartos, H., Bosserhoff, A., Bartenschlager, R., and Schaller, H. (1994). Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription. *J Virol* **68**(5), 2994-9.
- Werr, M., and Prange, R. (1998). Role for calnexin and N-linked glycosylation in the assembly and secretion of hepatitis B virus middle envelope protein particles. *J Virol* **72**(1), 778-82.
- Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Buscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R., and Schaller, H. (1987). Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* **61**(3), 904-11.
- Wilson, R., Allen, A. J., Oliver, J., Brookman, J. L., High, S., and Bulleid, N. J. (1995). The translocation, folding, assembly and redox-dependent degradation of secretory and membrane proteins in semi-permeabilized mammalian cells. *Biochem J* **307**(Pt 3), 679-87.

- Wunderlich, G., and Bruss, V. (1996). Characterization of early hepatitis B virus surface protein oligomers. *Arch Virol* **141**(7), 1191-205.
- Wynne, S. A., Crowther, R. A., and Leslie, A. G. (1999). The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol Cell* **3**(6), 771-80.
- Yee, J. K. (1989). A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus. *Science* **246**(4930), 658-61.
- Yeh, C. T., Liaw, Y. F., and Ou, J. H. (1990). The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J Virol* **64**(12), 6141-7.
- Yuh, C. H., and Ting, L. P. (1990). The genome of hepatitis B virus contains a second enhancer: cooperation of two elements within this enhancer is required for its function. *J Virol* **64**(9), 4281-7.
- Zhang, J. T., Duthie, M., and Ling, V. (1993). Membrane topology of the N-terminal half of the hamster P-glycoprotein molecule. *J Biol Chem* **268**(20), 15101-10.
- Zhou, S., Yang, S. Q., and Standing, D. N. (1992). Characterization of hepatitis B virus capsid particle assembly in *Xenopus* oocytes. *J Virol* **66**(5), 3086-92.
- Zhu, Q., von Dippe, P., Xing, W., and Levy, D. (1999). Membrane topology and cell surface targeting of microsomal epoxide hydrolase. Evidence for multiple topological orientations. *J Biol Chem* **274**(39), 27898-904.
- Zimmermann, R. (1998). The role of molecular chaperones in protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *Biol Chem* **379**(3), 275-82.
- Zimmermann, R., and Mollay, C. (1986). Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum. Requirements for membrane insertion, processing, and sequestration. *J Biol Chem* **261**(27), 12889-95.
- Zoulim, F., Saputelli, J., and Seeger, C. (1994). Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol* **68**(3), 2026-30.
- Zoulim, F., and Seeger, C. (1994). Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J Virol* **68**(1), 6-13.

VII. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATTC	American Type Culture Collection
BiP	Bindungs- (Binding-) Protein
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
CAD	zytosolische Verankerungsdomäne (Cytosolic Anchorage Domain)
ccc	kovalent geschlossen zirkulär (covalently closed circular)
DHBV	Enten Hepatitis-B-virus (Duck Hepatitis B Virus)
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Sequenzwiederholung (Direct Repeat)
DTAF	Dichlorotriazinylamino-Fluorescein
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminiscense
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENH	Enhancer-Element
e-präS	externe präS-Orientierung
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FCS	Fötale Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FTCD	Formiminotransferase-Cyclodeaminase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GRE	Glucocorticoid-Responsive Element
Grp78	entspricht BiP
GSHV	Erdhörnchen Hepatitis-Virus (Ground Squirrel Hepatitis Virus)
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HBS	Hepes gepufferte Salzlösung (Hepes Buffered Saline)
HBsAg	Hepatitis-B-Oberflächenantigen (Hepatitis B surface Antigen)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HHBV	Reiher Hepatitis-B-Virus (Heron Hepatitis B Virus)
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
hMTTta	humaner Metallithionin IIa Promotor
HNF	Nukleärer Hepatozytenfaktor (hepatocyte nuclear factor)
HRPO	Meerrettich (horseradish) Peroxidase
Hsc	Hitzeschock-Protein (konstitutiv)
Hsp	Hitzeschock-Protein
IC	Intermediäres Kompartiment

Ig	Immunglobulin
INF	Interferon
i-präS	interne präS-Orientierung
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
MEM	Minimal Essential Medium
MHV	Maus-Hepatitis-Virus
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
NEM	N-Ethylmaleinimid
NLS	Kernlokalisationssignal (Nuclear Localisation Signal)
NP-40	Nonidet-40
NRE	Negativ-regulierendes Element
nt	Nukleotid
OPD	Ortho-Phenyldiamindihydrochlorid
ORF	offener Leserahmen (Open Reading Frame)
OST	Oligosaccharyl-Transferase-Komplex
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PLB	Phospholamban
PKC	Proteinkinase C
PNGaseF	Peptid:N-Glykosidase F
PNS	postnukleärer Überstand (Post Nuclear Supernatant)
poly-A	Polyadenylierungssignal
PRO	Promotor-Element
RAMP	Ribosom-assoziiertes Membranprotein
rcDNA	offen-ringförmigen DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNaseH	Ribonuklease H
RRX	Rhodamin RedX
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Abstandshalter (Spacer)-Region
SPC	Signalpeptidase-Komplex
SR	Signalerkennungs-Partikel-Rezeptor
SRP	Signalerkennungs-Partikel (Signal Recognition Particle)
SV40	Affen (Simian) Virus 40
TBS	Tris-HCl-gepufferte Salzlösung (Tris Buffered Saline)
TCA	Trichloresigsäure
TLM	Translokationsmotiv
TM	Transmembrandomäne
TP	Terminales Protein
TRAM	Translocating Chain-Associated Membrane
TRAP	Translokon-assoziiertes Membran-Komplex
WHV	Waldmurmeltier Hepatitis-Virus (Woodchuck Hepatitis Virus)
wt	Wildtyp

2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematischer Aufbau des Hepatitis-B-Virus.....	3
Abb. 2:	Die Organisation des HBV-Genoms.	5
Abb. 3:	Schematische Darstellung des Infektions- und Replikationszyklus von HBV.....	7
Abb. 4:	Reverse Transkription des HBV-Genoms.....	9
Abb. 5:	Struktureller Aufbau der HBV-Hüllproteine.....	12
Abb. 6:	Die transmembrane Topologie der HBV-Hüllproteine in der ER-Membran.....	13
Abb. 7:	Schematische Darstellung der konstruierten HBV L-Mutanten.....	22
Abb. 8:	Trypsinschutzversuch zur Kontrolle der Integrität verwendeter Mikrosomen.....	36
Abb. 9:	Überprüfung der Topologie des Epitop-markierten L-Proteins: L_{HA} verhält sich wie L_{wt}	39
Abb. 10:	Die posttranslationale präS-Translokation von L benötigt weder M- noch S-Proteine.....	41
Abb. 11:	Die posttranslationale präS-Translokation ist nicht von einer kovalenten Di-/Oligomer-Bildung von L-Monomeren abhängig.....	42
Abb. 12:	Die Bedeutung einzelner TM für die posttranslationale präS-Translokation: TM1, TM3 und TM4 werden nicht benötigt.....	45
Abb. 13:	Die Bedeutung einzelner TM für die posttranslationale präS-Translokation: TM2 ist notwendig.....	47
Abb. 14:	TM2 ist für die präS-Translokation ausreichend.....	49
Abb. 15:	Die präS-Translokation der Mutante $L_{\Delta TM1/3/4}$ erfolgt posttranslational.	50
Abb. 16:	Coronavirus TM-Segmente sind nicht in der Lage, eine posttranslationale präS-Translokation herbeizuführen.	51
Abb. 17:	Das präS2-Translokationsmotiv (TLM) spielt keine Rolle bei der posttranslationalen präS-Translokation von L.....	53
Abb. 18:	Analyse der präS-Translokation bei der chimären Mutante $\text{präS}_{HBV}\text{S}_{DHBV}$	55
Abb. 19:	Analyse der präS-Translokation bei der chimären Mutante $\text{präS}_{DHBV}\text{S}_{HBV}$	56
Abb. 20:	Intrazelluläre Lokalisation des L-Proteins.....	59
Abb. 21:	Der Golgi-Komplex ist für die präS-Translokation entbehrlich.	61
Abb. 22:	Die posttranslationale präS-Translokation erfolgt an der ER-Membran.....	63
Abb. 23:	Analyse der Membranverankerung von L: L ist auch 30 Minuten nach seiner Synthese nicht vollständig in die Lipidschicht integriert.....	65

Abb. 24: Das L-Protein interagiert mit Hsc70 und BiP.....	67
Abb. 25: Hsp40 ist an der Interaktion von L mit Hsc70 beteiligt.....	68
Abb. 26: Analyse des L-BiP- und L-Hsc70-Komplexes.....	68
Abb. 27: Analyse des S- und L-Proteins nach <i>In vitro</i> -Translation und -Translokation.....	70
Abb. 28: Analyse der L-Topologie nach <i>In vitro</i> -Translation.....	71
Abb. 29: Analyse der L-Topologie nach <i>In vitro</i> -Translation unter ATP-Zugabe bzw. - Depletion.....	72
Abb. 30: Modell zur topologischen Reorientierung der präS-Domäne mittels eines L- spezifischen Transmembrankanals.....	76
Abb. 31: Helicales Rad von TM2 des L-Proteins.....	77
Abb. 32: Hydrophobizitätsdiagramm nach Kyte und Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982) des L _{HA} -Proteins.....	78
Abb. 33: Modell zur posttranslationalen präS-Translokation mit Hilfe des ER- Translokons.....	85